FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1960

THÈSE

N° 653

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

DIPLOME D'ÉTAT

PAR

Joseph TANZER

né le 4 Février 1926 à Paris XIX°

Interne des Hôpitaux de Paris

Présentée et soutenue publiquement le :

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA CULTURE DES CELLULES SANGUINES SUIVANT LES METHODES D'OSGOOD.

Observations sur l'incorporation de la thymidine tritiée par la technique autoradiographique.

Président : Mr. Jean BERNARD, Professeur.

ÉDITIONS A. G. E. M. P. — 8, RUE DANTE · PARIS-Ve

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1960

THÈSE

N°

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

DIPLOME D'ÉTAT

PAR

Joseph TANZER

né le 4 Février 1926 à Paris XIX°

Interne des Hôpitaux de Paris

Présentée et soutenue publiquement le :

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA CULTURE DES CELLULES SANGUINES SUIVANT LES METHODES D'OSGOOD.

Observations sur l'incorporation de la thymidine tritiée par la technique autoradiographique.

Président : Mr. Jean BERNARD, Professeur.

ÉDITIONS A. G. E. M. P. — 8, RUE DANTE - PARIS-Ve

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

PROFESSEURS

18-1-60

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

18-1-60

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. Aubin (A.), Bénard (H.), Brocq (P.), Bulliard (H.), Cadenat (F.), Chabrol (E.), Champy (C.), Chevallier (P.), Debré (R.), Donzelot (E.), Gastinel (P.), Guillain (G.), Halphen (E.), Harvier (P.), Hazard (R.), Heuyer (G.), Lantuejoul (P.), Laroche (G.), Laubry (C.), Lévy-Solal (E.), Lian (C.), Loeper (M.), Marion (G.), Mathieu (P.), Mocquot (P.), Mondor (H.), Monod (R.), Moreau (R.), Olivier (E.), Pasteur Vallery-Radot, Petit-Dutaillis, Richet (C.), Strohl (A.), Tanon (L.).

DOYEN . . . . . **Léon BINET.**
Membre de l'Institut

ASSESSEUR. . . . . . **Jean VERNE.**

I. — PROFESSEURS

	MM.
Anatomie	CORDIER (G.)
» (Prof[r] à titre personnel)	DELMAS (A.)
Anatomie pathologique	DELARUE (J.)
Anesthésiologie	BAUMANN (J.)
Bactériologie	FASQUELLE (R.)
Biochimie médicale	JAYLE (M. F.)
» » (Prof[r] à titre personnel)	SCHAPIRA (G.)
Biologie appliquée à l'Education physique et aux Sports	CHAILLEY-BERT (P.)
Biologie médicale	FAUVERT (R.)
» » (Prof[r] à titre personnel)	BOURLIÈRE (F.)
Cancérologie médicale et sociale	BERNARD (J.)
Clinique carcinologique chirurgicale (Inst. G. Roussy)	REDON (H.)
Clinique cardiologique (Broussais)	MOUQUIN (M.)
Cliniques chirurgicales — Beaujon	SICARD (A.)
Cliniques chirurgicales — Cochin	QUÉNU (J.)
Cliniques chirurgicales — Hôtel-Dieu	PATEL (J.)
Cliniques chirurgicales — Saint-Antoine	GOSSET (J.)
Cliniques chirurgicales — Salpêtrière	MOULONGUET (P.)
Clinique de chirurgie infantile et orthopédique (Enfants-Malades)	FÈVRE (M.)
Clinique chirurgicale orthopédique et réparatrice (Cochin)	MERLE D'AUBIGNÉ (R.)
Clinique de chirurgie cardio-vasculaire (Broussais)	GAUDART-D'ALLAINES (F. de)
Clinique de chirurgie pleuro-pulmonaire (Laënnec)	MATHEY (J.)
Clinique endocrinologique (Pitié)	DECOURT (J.)
Clinique de génétique médicale (Enfants-Malades)	LAMY (M.)
Clinique gynécologique (Broca)	FUNCK-BRENTANO (P.)
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques (St-Louis)	DEGOS (R.)
Clinique des maladies des enfants (Enfants-Malades)	CATHALA (J.)
Clinique des maladies infectieuses (Claude-Bernard)	MOLLARET (P.)
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale (Ste-Anne)	DELAY (J.)
Clinique des maladies métaboliques (Necker)	HAMBURGER (J.)
Clinique des maladies du sang (Broussais)	MARCHAL (G.)
Clinique des maladies du système nerveux (Salpêtrière)	ALAJOUANINE (T.)
Cliniques médicales — Boucicaut	LENÈGRE (J.)
Cliniques médicales — Broussais	SOULIÉ (P.)
Cliniques médicales — Cochin	JUSTIN-BESANÇON (L.)
Cliniques médicales — Hôtel-Dieu	BARIÉTY (M.)
Cliniques médicales — Pitié	DREYFUS (G.)
Cliniques médicales — St-Antoine	KOURILSKY (R.)
Clinique médicale d'hydrologie thérapeutique et climatologie (Bichat)	DEBRAY (C.)
Clinique médicale propédeutique (Broussais)	GENNES (L. de)
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies de la nutrition (Hotel-Dieu)	DEROT (M.)
Clinique de neuro-chirurgie (Pitié)	DAVID (M.)
Cliniques obstétricales — Baudelocque	LACOMME (M.)
Cliniques obstétricales — Foch (Suresnes)	MERGER (R.)
Clinique obstétricale et gynécologique (Port-Royal)	VARANGOT (J.)
Clinique ophtalmologique (Hôtel-Dieu)	RENARD (G.)
Clinique oto-rhino-laryngologique (Laribolsière)	AUBRY (M.)
Clinique de pédiatrie et de puériculture (St-Vincent-de-Paul)	LELONG (M.)
Clinique de pédiatrie Sociale (Enfants-Malades)	MARIE (J.)
Clinique de pneumo-phtisiologie (Laënnec)	BERNARD (E.)
Clinique psychiatrique infantile (Salpêtrière)	MICHAUX (L.)
Clinique de rhumatologie médicale et sociale (Cochin)	COSTE (F.)
Clinique stomatologique (Pitié)	DECHAUME (M.)
Clinique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard)	SÉNÈQUE (J.)
Clinique thérapeutique médicale (St-Antoine)	LEMAIRE (A.)
Clinique urologique (Cochin)	FEY (B.)
Embryologie	GIROUD (A.)
Histoire de la médecine et de la chirurgie (Laribolsière)	SÈZE (S. de)
Histologie	VERNE (J.)

	MM.
Hygiène et clinique de la première enfance (Trousseau)	TURPIN (R.)
Hygiène et médecine préventive	JOANNON (P.)
— — (Profr à titre personnel)	DEPARIS (M.)
Médecine du Travail	DESOILLE (H.)
Médecine légale	PIÉDELIÈVRE (R.)
Parasitologie	GALLIARD (H.)
Pathologie chirurgicale	COUVELAIRE (R.)
Pathologie exotique	LAVIER (G.)
Pathologie expérimentale et comparée	MERKLEN (F.-P.)
Pathologie médicale	MILLIEZ (P.)
Pathologie et thérapeutique générales	GARCIN (R.)
Pharmacologie	CHEYMOL (J.)
» (Profr à titre personnel)	LÉVY (Mlle J.)
Physiologie	BINET (L.)
» (Profr à titre personnel)	BARGETON (D.)
Physique médicale	DOGNON (A.)
» » (Profr à titre personnel)	DJOURNO (A.)
Radiologie médicale	DESGREZ (H.)
Technique chirurgicale et Chirurgie expérimentale	LÉGER (L.)
Thérapeutique	BROUET (G.)

II. — PROFESSEURS SANS CHAIRE, PROFESSEURS AGRÉGÉS ET MAITRES DE CONFÉRENCES - AGRÉGÉS

	MM.
Anatomie	CABROL (C.) COUINAUD (C.) OLIVIER (G.)
Anatomie pathologique	GAUTHIER-VILLARS (Mlle P.) pr. s. ch. BUSSER (F.) GOUYGOU (Ch.) ORCEL (L.) PAILLAS (J.)
Anesthésiologie	VOURC'H (G.)
Bactériologie	NÉVOT (A.) pr. s. ch. BARBIER (P.) CHRISTOL (D.) TOURNIER (P.)
Biochimie médicale	DESGREZ (P.), pr. s. ch. POLONOWSKI (J.), m. conf.
Biologie appliquée à l'Éducation Physique et aux Sports	PLAS (F.)
Carcinologie	DENOIX (P.) MATHE (G.)
Dermato-Syphiligraphie	DUPERRAT (B.)
Electro-Radiologie	LEDOUX-LEBARD (G.)
Embryologie	TUCHMANN-DUPLESSIS (H.), pr. s. ch.
Hématologie	BILSKI-PASQUIER (G.) DAUSSET (J.)
Histologie	COUJARD (R.) pr. s. ch. MAROIS (M.) RACADOT (J.)
Hydrologie	CORNET (A).
Hygiène	BOYER (J.), pr. s. ch. CORRE-HURST (Mme L.)
Maladies infectieuses	BASTIN (R.) DUPONT (V.)
Médecine légale	DERCBERT (L.), pr. s. ch. HADENGUE (A.) FOURNIER (E.) GUENIOT (M.)
Médecine du travail	ALBAHARY (C.)
Neurologie	LHERMITTE (F.)
Obstétrique	GRANJON (A.) HERVET (E.) LE LORIER (G.) MORIN (P.) MUSSET (R.) ROBEY (M.) THOYER-ROZAT (J.)
Ophtalmologie	BRÉGEAT (P.) SARAUX (H.)
Orthopédie	JUDET (R.) RAMADIER (J.)
Oto-rhino-Laryngologie	DEBAIN (J.)
Parasitologie	BRUMPT (L.C.), pr. s. ch. CHABAUD (A.)
Pathologie chirurgicale	BARCAT (J.) BINET (J.-P.) CAUCHOIX (J.) CHATELIN (C.-L.) DUBOST (Ch.) DUBOST (Cl.) FAUREL (J.) FLABEAU (F.) GERMAIN (A.) LAURENCE (G.) agr. per. LORTAT-JACOB (J.-L.) LOYGUE (J.) MERCADIER PERROTIN (J.) ROBERT (H.) THOMERET (G.)
Pathologie exotique	SCHNEIDER (J.)
Pathologie expérimentale	CROSNIER (J.) HARTMANN (L.) LŒPER (J.) MAURICE (J.) RICHET (G.)
Pathologie médicale	AUSSANNAIRE (M BOUR (H.) BOUVIER (J.) BOUVRAIN (Y.) BRICAIRE (H.) BRISSAUD (H.) BROCARD (H.) BUGE (A.) CASTAIGNE (P.), m. conf. CATINAT (J.) CONTAMIN (F.) COURY (C.) FREZAL (J.) HOUSSET (E.) LAROCHE (Cl.) LESOBRE (R.) MACREZ (C.) NICK (J.) PEQUIGNOT (H.) m. conf. ROYER (P.) WOLFROMM (R.)

	MM.
Pédiatrie-Puériculture	JOSEPH (R.) MANDE (R.) MOZZICONACCI (P.) POLONOVSKI (C.) ROSSIER (A.)
Pharmacologie	BOISSIER (J.) LECHAT (P.)
Physiologie	PARROT (J.), pr. s. ch. DEJOURS (P.)
Physique médicale	GOUGEROT (L.), m. conf. pr. s. ch. KELLERSHOHN
Pneumo phtisiologie	KREIS (B.)
Psychiatrie	PICHOT (P.)
Psychiatrie infantile	DUCHÉ (D.)
Rhumatologie	DELBARRE (F.)
Stomatologie	CERNÉA (P.) CHAPUT (Mme A.), m.c. agr GRELLET (M.)
Thérapeutique	CHASSAGNE (P.) LAMOTTE (M.)
Urologie	QUENU (L.)

III. — PROFESSEURS SANS CHAIRE ET AGRÉGÉS CHARGÉS DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE

à titre permanent.

	MM.
Anatomie	DEBEYRE
Clinique chirurgicale	ABOULKER (P.) AMFLINE (A), pr. s. ch. HUGUIER (J.) OLIVIER (C.) PADOVANI (P.) POILLEUX (F.) ROUX (M.) VERNE (J.-M.)
Clinique médicale	BOUDIN (G.) CONTE (M.) DOMART (A.) PERRAULT (M.) RAMBERT (P.) THIEFFRY (S.) TURIAF (J.)
Clinique obstétricale	GRASSET (J.) LEPAGE (F.) MAYER (M.) RAVINA (J.)
Clinique ophtalmologique	DESVIGNES (P.) OFFRET (G.)
Clinique oto-rhino-laryngologique	MADURO (R.)
Clinique pédiatrique et puériculture	LAPLANE (R.)
Clinique psychiatrique	BARUK (H.)
Clinique urologique	KUSS (R.)
Médecine légale	GAULTIER

IV. — PROFESSEURS DÉTACHÉS DANS LES UNIVERSITÉS ÉTRANGÈRES

Bactériologie	HAUDUROY (P.) Pr. s. ch
Biochimie médicale	ETTORI (J.) Pr. à t. pers.
Pathologie chirurgicale	RUDLER (J.) Pr. s. ch.

Secrétaire général de la Faculté	M. LENA (J.)
Secrétaires	Mme BEURLAND (H.), Mlle CHAINTREUIL (G.), Mlle HURÉ (A.)
Conservateur en Chef	M. le Docteur HAHN (A.)
Conservateurs	Mlles DUMAITRE (P.), GOICHON (A-M.)
Bibliothécaires	Mmes CONTET (J.), FORGET (F.), Mlles LAURENT (H.,), LE NOIR (G.), QUIÉVREUX (E.)

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considerées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A la mémoire de mes chers parents

A ma femme

A ma soeur

A mon oncle et ma tante

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549219_0010

A mon Maître

Monsieur le Professeur Jean BERNARD

qui a influencé si profondément mon orientation, m'a si constamment encouragé

et qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

En respectueux hommage

A Monsieur le Professeur BUGNARD

Directeur de l'Institut National d'Hygiène

en témoignage de mon respectueux dévouement.

A mon Maître

Monsieur le Professeur Edwin E. OSGOOD

Il m'a donné ce sujet de travail, et m'a sans cesse apporté l'appui de ses bienveillants conseils

En déférente expression de ma gratitude.

A Monsieur John BROOKE

qui m'a guidé tout au long de l'heureuse année que j'ai passée à Portland

En gage d'amitié

A mes maîtres dans les Hôpitaux de Paris

Externat Monsieur le Professeur J. PATEL

Monsieur le Docteur P. de BRUN du BOIS NOIR

Monsieur le Docteur J. SALLET

Monsieur le Docteur J. BOUSSER

Monsieur le Professeur J. BERNARD

Internat Monsieur le Docteur P. GRENET

Monsieur le Docteur A. LAPORTE

Monsieur le Professeur Agrégé R. JOSEPH

Monsieur le Professeur Agrégé R. MANDE

Monsieur le Professeur Agrégé L. AUQUIER

Monsieur le Docteur J.J. WELTI

Monsieur le Docteur J. BOUSSER

Monsieur le Professeur L. MICHAUX

Monsieur le Professeur J. BERNARD

A Monsieur le Professeur Agrégé G. MATHE

A Monsieur le Docteur R. ROBINEAUX

qui m'ont apporté si fréquemment
leurs conseils

En témoignage de ma reconnaissance

A mes amis de toujours

R. et C. DELFIRE

G. LINET

J. VERGEYLEN

A tous mes amis de l'Internat

Ce travail a pu être realisé en grande partie grâce à une bourse du Public Health Service des Etats-Unis d'Amérique, que nous remercions très vivement.

INTRODUCTION

L'étude de l'incorporation de la thymidine tritiée a ouvert des voies nouvelles aux recherches concernant la cinétique des proliférations cellulaires notamment pour le système hématopoïétique. Dans notre travail cette incorporation a été suivie, par autoradiographie essentiellement, sur les cellules qu'Osgood et ses collaborateurs ont isolées à partir de sang humain il y a plusieurs années et qui continuent de se multiplier activement in vitro.

Cette étude, portant sur le système relativement simple que constitue une culture, peut être considérée comme une modeste approche à ces recherches dont l'ambition est non seulement de décrire exactement la vie des diverses cellules sanguines, mais encore de mettre en équations le fonctionnement des organes hématopoïétiques (189, 190)

Certes les connaissances déjà acquises en ce qui concerne la série rouge font bien augurer de l'avenir : les études de production et de survie des hématies sont devenues de pratique courante en clinique (21). Mais le but parait plus lointain lorsqu'on constate les divergences de vue fondamentales qui persistent sur la lignée lymphocytaire par exemple, (217).

Thymidine tritiée et autoradiographie ne sont pas les seuls nouveaux moyens de ces recherches, (120) mais nous nous contenterons d'étudier ici les techniques de culture de tissus et d'autoradiographie qui sont à la base de la réalisation de ces expériences et de passer en revue nos connaissances sur le métabolisme de l'acide désoxyribonucléique (ADN) sur lesquelles repose leur interprétation.

Nous profiterons de ces chapitres préliminaires pour mentionner ce que ces techniques ont apporté de façon plus ou moins directe à l'hématologie.

CHAPITRE PREMIER

CULTURE DE TISSUS

LES DEBUTS DE LA CULTURE DE TISSUS

La culture de tissus s'est développée très naturellement à partir de certaines des techniques en usage en embryologie à la fin du XIXè siècle.

En 1885 Wilhem ROUX maintient en survie pendant quelques jours dans une solution saline tiède la plaque médullaire d'un embryon de poulet. Grâce à cette "explantation" il obtient in vitro la fermeture de la plaque en tube neural et il prouve ainsi que ce n'est pas la pression des structures adjacentes qui entraine cette transformation. Deux ans plus tard Arnold (8) s'adresse à des cellules sanguines : il implante des fragments de moelle de bouleau sous la peau d'une grenouille. Quand ils sont envahis par les leucocytes il les transporte dans une solution saline tiède où ceux-ci migrent et survivent quelques jours.

Il faut attendre ensuite 1898 où Ljunggren démontre par réimplantation, que la peau humaine peut survivre plusieurs jours dans du liquide d'ascite.

En 1903 JOLLY(105) utilisant des leucocytes de batracien observe le

premier des divisions cellulaires in vitro : celles-ci persistent après 8, 10, 15 jours même.

Mais on peut dire que c'est Ross Harrison qui en 1907 inaugure réellement la technique de cultures de tissus lorsqu'il entreprend d'étudier in vitro la genèse des fibres nerveuses. Il place de petits fragments de moelle épinière d'embryon de grenouille sur une lamelle au sein d'une goutte de lymphe coagulée. Il renverse la lamelle sur une lame creuse et la scelle. Il peut ainsi observer dans le caillot le développement des axones à partir des corps cellulaires. Le problème de l'axonogénèse que les histologistes n'avaient pu résoudre par les méthodes ordinaires est ainsi éclairci par cette technique dynamique (94).

Harrison, d'autre part, vient d'introduire la technique de la goutte pendante, technique de base de la culture de tissus et relativement facile à reproduire.

Les techniques "traditionnelles" sont alors rapidement établies. Burrows étudiant avec Harrison introduit l'usage du plasma coagulé. (40). La plus grande difficulté à ce moment est d'éviter la contamination bactérienne et Carrel, déjà Prix Nobel pour ses travaux de chirurgie expérimentale apporte à la culture ses connaissances des techniques aseptiques. En association avec Burrows il découvre d'autre part les puissants effets des extraits tissulaires et notamment embryonnaires sur la multiplication cellulaire in vitro (43, 44). Il obtient ainsi de façon constante des résultats satisfaisants et il est responsable du développement de la culture de tissus dans les années qui suivent.

Mais pendant de très nombreuses années encore le travail va rester minutieux, difficile et quelque peu fastidieux, malgré quelques perfectionnements : cultures dans les divers types de flacons de Carrel où le caillot est recouvert de milieu liquide, sur double lamelle (Maximov 1925), en tubes (Gey 1933, Lewis 1934). L'aménagement du Laboratoire est bien complexe, la préparation des milieux bien longue. C'est pourtant dans ces conditions que Carrel démontre que des cellules animales peuvent être cultivées in vitro pendant un temps pratiquement illimité ; (il va maintenir ainsi en multiplication active une souche de cellules d'embryon de poulet pendant 34 ans.).

Mais si nombre de biologistes hésitent devant ces difficultés, toute une série de travaux est cependant entreprise où l'on étudie la technique de la culture elle-même, ses milieux etc...

Très tôt W. et M. Lewis cherchent à fabriquer des milieux artificiels assurant la survie et la pousse (131, 132). Baker et Carrel tentent, par

des techniques analytiques d'identifier les constituants importants des produits naturels (13, 44, 46).

Ce genre de travail est poursuivi par Fischer (70, 72, 73) et plus récemment par un grand nombre de chercheurs parmi lesquels Parker, Healy, Morgan, White, Waymouth, Eagle et a abouti aux milieux synthétiques d'aujourd'hui qui permettent avec un minimum de sérum (parfois égal à O pour certaines souches) la multiplication active et indéfinie des cellules. La perfection des méthodes actuelles de cultures doit beaucoup au groupe de W. Earle : ce groupe a été le premier à faire pousser des cellules en grande quantité directement sur le verre, le premier à obtenir des "clones" à partir d'une cellule unique. Ils ont aussi développé les méthodes de culture en suspension.

C'est qu'en effet les promesses de valeur de la culture de tissus en tant que moyen d'étude en biologie sont apparues d'emblée aux histologistes, aux hématologistes, aux cancérologues, aux biochimistes etc... Mais c'est son utilité en virologie qui tout de suite se montre primordiale.

Dès 1913, Steinhardt et Israeli et Lambert (202) montrent que le virus de la vaccine persiste plusieurs semaines dans du tissu cornéen explanté. En 1935, Parker et Nye (171) établissent que le même virus se multiplie dans une culture de testicule de lapin. Dans les années qui suivent des expériences similaires portant sur la vaccine, le sarcome de Rous (175, 45) sont rapportées par Carrel et Rivers. En 1928 Maitland H.B. et Maitland M.C. développent une méthode très simple de culture de tissu pour obtenir la multiplication du virus vaccinal et en 1935 Rivers et Wards vaccinent avec du virus cultivé in vitro (191)

Un facteur de développement de la culture de tissus va être constitué par la découverte des antibiotiques. Leur aide et les simplifications de technique vont permettre le plein essor de la méthode. On peut d'ailleurs dire que ce n'est qu'alors que la virologie est dotée de son "animal" d'expérience ; les découvertes retentissantes de ces dernières années dans ce domaine le montrent : découverte de nombreux agents viraux nouveaux, diagnostic des affection virologiques, fabrication de vaccins et notamment celui de la poliomyélite sont l'aboutissement de ce travail.

A côté de la culture de tissus animaux in vitro se sont développées trois techniques voisines.

La culture in vivo dont on peut trouver l'origine dans l'expérience de Léo Loeb (135) qui cultive des fragments d'épiderme de Cobaye inclus dans de petits blocs faits de gélose et de sérum, insérés sous la peau d'oreille de lapin.

L'implantation de tissus dans la chambre antérieure de l'oeil et surtout la technique des chambres de diffusion dont Clark a l'idée en 1930 mais dont le développement est dû surtout à Algire et à son école (4, 5) ont abouti à des résultats intéressants.

Une toute autre approche à la culture de tissus in vitro est le fait de Fell : elle se propose non pas de faire pousser des cellules aussi vite que possible mais de maintenir de petits fragments de tissus dans un état aussi voisin que possible de leur état in vivo. La culture "d'organe" dans ses mains et dans celles notamment de Gaillard, des Wolff a fournit un précieux contingent d'informations en embryologie et en endocrinologie. Les cultures de ganglions de Trowell (216), de moelle de Reisner (187) sont basées sur des principes voisins.

La culture de tissus végétaux s'est développée parallèlement mais l'échange d'informations entre les deux champs d'investigation ne date guère que de quelques années. Nous citerons seulement, dans ce domaine, les noms de l'initiateur Haberland, des premiers expérimentateurs plus heureux : Molliard, Kotte, Robbins. L'intérêt pour ces recherches disparait jusqu'à ce que White, Gautheret développent des milieux adéquats.

LES TECHNIQUES ACTUELLES

Si la technique de base, celle qu'on enseigne au débutant, reste celle de la goutte pendante ce n'est pourtant pas en raison de sa simplicité.

Mais il est intéressant d'étudier les éléments des techniques actuelles en se référant à ceux de la technique d'Harrison, Burrows et Carrel dont ils sont dérivés.

Rappelons donc en quelques mots la préparation d'une "goutte pendante" : en procédant de façon strictement aseptique une goutte de plasma est déposée au centre d'une lamelle carrée, on y place un fragment de tissu puis une goutte d'extrait embryonnaire dilué par une solution saline tamponnée ; le fragment de tissu se trouve enveloppé et maintenu dans le caillot qui se forme. Une lame à concavité sur les bords de laquelle deux traces de vaseline ont été déposées est alors renversée sur la lamelle à laquelle elle adhère. On lutte à la paraffine de manière à assurer l'étanchéité de la petite enceinte gazeuse, à la partie supérieure de laquelle se trouve la culture. La lame est alors incubée à 37°. Les cellules migrent et se divisent dans le caillot et il faut très vite procéder à des repiquages : la lamelle est décollée avec une lame de rasoir, la partie du plasma infiltrée de cellules est alors disséquée en 2 ou 4 fragments et chacun de ceux-ci est traité comme un nouvel explant. En fonction de ceci examinons maintenant les divers points des techniques usuelles.

LE LABORATOIRE

Après qu'il était nécessaire au temps de Carrel de disposer d'un laboratoire stérile, de travailler de façon constante avec toutes les précautions nécessaires en chirurgie osseuse, tout ceci est aujourd'hui

bien simplifié. Il suffit en effet de disposer d'une "hotte" pourvue d'une lampe à U.V. placée elle-même dans un laboratoire tenu relativement propre grâce à quelques lampes U.V. Les antibiotiques (les antifungiques éventuellement) ajoutés au milieu de culture viennent aider puissamment à maintenir la stérilité des cultures. Du moins est-il assez aisé de préserver les cellules des contaminations bactériennes et fungiques. Mais en fait bien des cultures sont infectées par des virus latents dont des études récentes sur les phénomènes d'interférence (49) viennent de montrer toute l'importance.

LES FLACONS

Nous irons très vite sur ce chapitre car les formes prises par le verre et plus récemment par les matières plastiques sont innombrables. Certaines matières plastiques ont l'avantage d'être totalement inertes.

Les verres même durs (Pyrex), neutres (Neutraglass) sont parfois toxiques du fait impuretés qui se dissolvent lentement dans le milieu, tandis que l'expérience montre que de nombreux flacons à pharmacie en verre ordinaire se révèlent inoffensifs. Il est possible d'autre part de revêtir les parois, si l'on n'a pas besoin qu'elles soient mouillables, d'une couche protectrice de silicone.

NETTOYAGE

Le nettoyage des récipients et de leurs bouchons doit être attentivement examiné, car il risque de laisser des produits très toxiques.

Un grand nombre de procédés ont été recommandés qui peuvent être divisés en trois grands groupes : alcalins, détergents, oxydants.

De très nombreux agents alcalins ont été utilisés, les plus populaires sont : le triphosphate, le carbonate et le métasilicate de sodium. Le dernier est probablement le plus communément employé car il n'introduit pas d'ions étrangers au verre et s'il en reste il se combine finalement au verre. Après ébullition il faut rincer avec une solution d'acide très dilué puis à l'eau distillée.

Les détergents sont de plus en plus employés car ils ne nécessitent pas d'ébullition. Par contre ils sont difficiles à éliminer et le rinçage doit être minutieux. Un détergent destiné spécialement à la culture de tissus le Microsolve, est fabriqué aux U.S.A. Il est pratiquement non toxique et seul un rinçage à l'eau est nécessaire.

Il est possible de recourir aux puissants agents oxydants que sont les acides sulfurique, chromique, et nitrique. Ce sont des produits très efficaces mais ils sont dangereux à manipuler et il est difficile d'en débarrasser le verre ensuite. Il est parallèlement nécessaire d'avoir un équipement spécial et le personnel doit être entrainé à son usage. C'est le mode de nettoyage utilisé par Earle.

Pour des raisons qu'on explique mal des flacons s'avèrent toxiques, malgré toutes les précautions, lors de leur première utilisation, et ne le sont plus ensuite.

Les bouchons de caoutchouc doivent lors du premier usage être "détoxiqués" par une ébullition prolongée dans une solution de NaOH à 5, 10 % suivie d'un rinçage avec un acide dilué et d'un second très prolongé à l'eau. Même alors ils conservent une certaine toxicité.

Tout ceci explique l'intérêt de la mise sur le marché de flacons de culture, boites de Petri en polystyrène de bonne qualité optique, mouillables, livrés stériles et dont le prix de revient est tel qu'on les jette après usage.

STERILISATION

Pour la stérilisation des différents objets on recourt à la chaleur sèche, à l'autoclave, à l'irradiation U.V., à l'ébullition dans l'alcool à 70°.

La stérilisation des milieux pose des problèmes particuliers et nous l'envisagerons en les étudiant.

L'ENVIRONNEMENT CELLULAIRE

La température idéale pour la plupart des cellules de mammifères se situe entre 36°5 et 37°5. Mais alors qu'une élévation même minime de température est souvent néfaste, une température plus basse est parfois souhaitable,(ainsi pour les cellules de la peau,) en tout cas facilement supportée. Pour les souches établies in vitro depuis longtemps surtout, un abaissement de la température à 25° ralentit quelque peu la pousse mais ne la stoppe pas. Nombre de cellules peuvent même être refroidies à + 4° pendant quelques heures sans qu'il en résulte d'autre dommage qu'un retard des divisions lors du retour à la température normale. Au-dessous de 0° les cellules sont détruites par la formation de cristaux de glace dans le cytoplasme. Mais en

ajoutant un agent tel que le glycérol et en refroidissant les cellules à une vitesse suffisante jusqu'à -70° les cellules peuvent être conservées à cette température durant des mois ; réchauffées rapidement ces cellules recommencent à se diviser. (95). Cette technique commence d'ailleurs à avoir des applications en hématologie (conservation de cellules hématopoïétiques pour la greffe, 215).

Les milieux : on a pu penser qu'il était nécessaire de fournir aux cellules, outre des éléments nutritifs, un réseau fibrineux de soutien et des produits capables d'exciter la pousse d'où l'usage respectif du plasma et des extraits tissulaires, embryonnaires notamment. Puis on s'est aperçu qu'une matrice spatiale n'était pas nécessaire et l'on a fait pousser les cellules sur des substrats divers : verre avant tout, cellophane (61, 198), matières plastiques diverses, gélose (185, 157, 220),, gel de méthylcellulose (98) et enfin l'on a commencé plus récemment à faire pousser les cellules en suspension (169, 59). Il est bien évident cependant que les cellules poussant sur un substrat plan ont une morphologie fort éloignée de leur morphologie au sein de l'organisme. De même les rapports entre les cellules sont complètement modifiés. A plus forte raison en suspension où chaque cellule est isolée. Ceci explique que la culture en plasma coagulé ou dans la matrice tridimensionnelle constituée par une éponge de cellulose (122, 123, 124) conserve de multiples indications.

En même temps l'on a montré progressivement que pour la plupart des cellules, l'extrait embryonnaire n'agissait qu'en introduisant de de petites molécules, des acides aminés essentiellement.

Cependant bien peu de cellules et seulement des couches cultivées depuis longtemps in vitro peuvent être maintenues en état de multiplication rapide sans au moins une petite quantité de macromolécules apportées par du sérum ou un liquide biologique de même type.

La pression osmotique du milieu est un premier facteur critique et être maintenue (203) aux environs de 310 milliosmoles ce qui correspond à un abaissement du point cryoscopique de 0,° 62. Cependant surtout si elle se produit progressivement une variation de plus ou moins 10 % ne parait pas être nuisible. Mais les variations en moins sont toujours mieux supportées que les variations en plus.

Le pH du milieu le plus favorable est de 7,2 à 7,4. Toutefois la plupart des tissus supportent des variations jusqu'à 6,6 et 7,8 pendant un certain temps. L'introduction dans le milieu de rouge de phénol permet de connaitre approximativement le pH à tout moment.

Les ions minéraux du milieu ne jouent pas seulement dans la régulation de la pression osmotique et du pH. On considère que le milieu doit nécessairement contenir les ions sodium, potassium, calcium, magnésium, fer, bicarbonate, phosphate et probablement sulfate ; si on ne sait exactement à quoi servent les ions sodium et potassium en dehors de leur rôle osmotique, il est certain que le calcium et le magnésium sont nécessaires à l'étalement et à l'adhérence des cellules sur le verre : on utilise d'ailleurs l'éthylène-diamine-tétra acétate de sodium (EDTA) qui chélate ces deux ions pour détacher les cellules. Le fer entre dans les pigments respiratoires. L'ion bicarbonate n'est pas qu'un facteur tampon primordial mais joue dans de nombreux processus fondamentaux. Les composés à liaison phosphate de haute énergie jouent un rôle essentiel dans la fourniture de l'énergie cellulaire. L'ion sulfate est activement incorporé dans les protéines cellulaires et doit être essentiel pour les cellules qui synthétisent des polymucosaccharides.

La présence d'oxygène et de gaz carbonique est probablement nécessaire à la survie des cellules.

Quelques cellules peuvent sans doute survivre pendant un temps considérable en l'absence d'oxygène, en obtenant toute leur énergie du processus de glycolyse anaérobie mais ceci ne peut durer au-delà d'un certain temps car certains des produits du cycle de Krebs sont nécessaires pour diverses synthèses. Mais notons tout de suite que certaines cellules ne prolifèrent qu'à une pression d'oxygène basse.

Il est virtuellement impossible d'exclure le gaz carbonique des cellules, car il est produit constamment au cours du métabolisme. Toutefois les expériences de Harris (92) suggèrent son caractère essentiel pour certaines cellules.

Etant donné d'autre part que l'ion bicarbonate est le plus important des ions réglant le pH (205) la plupart des systèmes exigent un contrôle de la tension de CO^2 dans la phase gazeuse, ce qu'on réalise par insufflation d'un mélange d'air et de 5 % de CO^2 dans le flacon de culture ou

en le fermant de façon étanche pour retenir le CO^2 produit par le métabolisme.

Les métabolites organiques essentiels.

Les glucides sous forme de glucose en général sont la source principale d'énergie des cellules, mais servent aussi à la synthèse d'acides aminés non essentiels, de purine de pyrimidines etc.... (56).

A l'opposé des cellules capables d'activité protéolytique pouvant survivre un temps considérable en l'absence de glucose, en utilisant des résidus d'amino acides comme source d'énergie, toutes les souches examinées jusqu'ici par Eagle (57) exigent de l'arginine de la cystéine, de la glutamine, de l'histidine et de la tyrosine en plus des huit acides aminés qui assurent l'équilibre azoté chez l'homme (195) : isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, tryptophane, valine. Mais les autres acides aminés non essentiels doivent de préférence être ajoutés au milieu. Pour certaines cellules ils sont en réalité essentiels : ainsi le carcinosarcome de Walker (139) exige de l'asparagine, les cellules de rein de singe en culture primaire de la glycine (57) . Par ailleurs la présence de sérine par exemple favorise la croissance des petites populations cellulaires (134) et donc l'isolement de lignées pures (clones).

Vitamines.

Un grand nombre de vitamines, du groupe B notamment, sont nécessaires : acide paraminobenzoïque, biotine, acide folique, acide nicotinique, acide pantothénique, pyridoxine, riboflavine, thiamine, inositol, choline. Il est intéressant de noter que certaines cellules, toutefois (58) n'ont pas besoin d'inositol et que si lon les fait pousser en symbiose avec des cellules qui en exigent, elles en fournissent à celles-ci.

Ces vitamines peuvent être introduites avec bénéfice sous la forme des coenzymes dans la composition desquels elles entrent.

Nucléosides :

On a montré de même que bien que les cellules soient capables de

synthétiser les acides nucléiques à partir de molécules très simples : CO^2, acide formique, glycine, elles utilisent de préférence les nucléosides s'ils sont ajoutés au milieu.

Milieux chimiquement définis. Dès lors est-il possible d'avoir des cultures à milieux chimiquement définis ? Beaucoup de cellules sont capables de survivre et même de se multiplier quelques temps dans de tels milieux mais si l'on veut obtenir une croissance optima il est nécessaire de rajouter une petite quantité (5, 10, 20 %) de sérum, de liquide amniotique, de liquide d'épanchement de carcinomatose pleurale ou pleurale ou péritonéale ou encore d'albumine purifiée ou de peptones. Il semble que ce sont surtout les grosses molécules de ces liquides qui sont utiles. La sérumalbumine (196) apporte peut-être des constituants élémentaires fixés sur sa molécule mais il existerait (133, 196) une alpha globuline douée de propriétés antitryptiques, particulièrement abondante dans le sang du cordon, d'où son nom de fétuine (75), qui favoriserait l'adhérence des cellules au verre, mais capable aussi d'améliorer la croissance des cellules en suspension.

Cependant une souche de fibroblastes de souris (souche L) pousse de façon très active dans le milieu NCTC 109 (143), milieu entièrement synthétique depuis 5 ans (59). De même le milieu 858 de Healy et Parker (96) et le milieu MB 752/1 de Waymouth (in 175) sont capables aussi d'assurer la croissance de la souche.

Fabrication des milieux : il est devenu de règle d'utiliser des milieux commerciaux complets ou que l'on complète.

Un milieu se prépare généralement en réunissant un ensemble de solutions de base. Le sérum d'origine humaine ou animale doit être testé du point de vue stérilité et du point de vue toxicité avant usage. Il est prudent de ne pas utiliser de sérum frais (in 204 p. 120) et de diminuer les risques de toxicité en réunissant du sérum de plusieurs donneurs. Il ne semble pas y avoir d'avantages, sauf pour des expériences d'immunologie, à recourir à des sérums autologues ou homologues. La filtration du sérum assure de sa stérilisation et de la non introduction de cellules du donneur mais elle risque d'apporter des produits toxiques et si un filtre très fin à verre fritté est employé, de livrer un sérum privé de molécules utiles (ainsi que nous avons pu le constater personnellement).

D'autres produits biologiques sont parfois employés : les extraits d'embryon de poulet, de veau, préparés de façon classique mais le groupe de Earle a montré que d'une part l'action de l'hyaluronidase, l'ultracentrifugation et la filtration sur verre fritté fournissent un extrait embryonnaire de valeur et d'autre part que les petites molécules de l'ultrafiltrat d'extrait embryonnaire et même d'oeufs de poule non fécondés avaient les mêmes propriétés que l'extrait embryonnaire brut. Pour des raisons essentiellement économiques on peut utiliser dans certains cas : le lait écrémé (15), un hydrolysat de lactalbumine (°) ou de caséine (°) qui fournit de petites molécules protéiniques (149, 129), un extrait de levures (°) qui apporte essentiellement des vitamines.

Voici le milieu utilisé pour les cultures sanguines par Osgood et collaborateurs, très proche du milieu de Eagle (57) . Quelques astuces de préparation utilisées dans le Laboratoire du Professeur Osgood nous paraissent valoir la peine d'être rapportées.

La solution saline principale (41) contenant de l'acide acétique est préparée ainsi : 100 ml d'une solution stock concentrée 10 fois sont additionnés de 900 ml d'eau désionisée sur colonne de résines échangeuses d'ions et distillée. Un litre de cette solution contient : Cl Na : 7,5 g - Cl K : 0,375 g - PO_4 Na_2 H : 0,12 g - PO_4 H_2 K : 0,03 g - SO_4 Mg, 7 H_2O : 0,07 g - CH_3 COO Na anhydre 0,5 g - glucose 2 g et 0,010 g de rouge de phénol.

Cette solution est versée dans des flacons à capuchons de caoutchouc où le vide est fait au-dessus du liquide. On peut alors stériliser à l'autoclave.

Une solution de Cl_2Ca à 25 g/litre et une solution de CO_3 H Na à 10 % sont préparées de la même façon.

Les solutions d'acides aminés, de glutamine, de vitamines peuvent être préparées au Laboratoire mais leur stérilisation est difficile. Aussi recourt-on volontiers aux solutions commerciales.

(°) Laboratoires de l'Institut Pasteur.

Pour préparer le milieu, on ajoute à 1 litre de la solution saline principale en piquant les bouchons avec des seringues munies d'aiguilles fines, au travers d'une couche d'alcool éthylique à 70°, 10 ml de la solution de $Cl_2.Ca$, 10 ml d'une solution d'acides aminés+, la quantité de CO_3HNa nécessaire pour amener au pH voulu (15-20 ml), 10 ml d'une solution de glutamine+, 10 ml d'une solution de vitamines+.

Le milieu contient alors les treize acides aminés et les neuf vitamines mentionnés plus haut.

On y ajoute encore 100 ml de sérum et 150 000 unités de pénicilline.

On peut utiliser aussi le milieu fait du liquide NCTC 109 de Earle+x (143) et de 10 % de sérum.

LES DIFFERENTS TYPES DE CULTURE :

Ils sont variés à l'infini car il peut s'agir de mise en culture de cellules nouvellement extraites d'un organisme vivant ou de cellules établies en culture depuis longtemps, car dans chacun de ces cas les différentes variétés de cellules n'ont pas les mêmes exigences, car les études histologiques, anatomopathologiques, biochimiques, pharmacologiques, virologiques etc... ont des moyens d'exploration différents, nécessitent des quantités de cellules différentes etc...

Nous allons donc nous limiter presque uniquement aux techniques utilisées pour la culture des cellules sanguines. Mais nous voudrions auparavant insister sur le fait que la culture de tissus nous paraît un mauvais moyen d'études morphologiques, surtout si on se limite aux techniques courantes d'examen.

+ Laboratoires Microbiological Associates, U.S.A.

x Laboratoires Difco, U.S.A.

Certes on peut parfois utiliser la culture de tissu pour préciser le diagnostic de nature d'une tumeur (154, 155), elle a permis à Maximov d'élargir sa théorie uniciste d'histogénèse des tissus sanguin et conjonctif. Mais lorsqu'on sait qu'en culture presque toutes les cellules peuvent être dites fibroblastiques, épithéliales ou amœboïdes (225), qu'il suffit de remplacer le sérum de cheval du milieu de culture de cellules HeLa S3 par du sérum humain pour que d'épithéliales elles deviennent fibroblastiques, on s'explique comment Maximov a pu croire que leslymphocytes se transforment en myélocytes (147). De même Bloom dans une discussion (27) affirme que de Bruyn a montré qu'un lymphoblaste au contact du verre, se déplace en adoptant la forme du miroir à main décrite par Rich, Wintrobe et Lewis (188), mais que s'il quitte le verre il adopte alors la marche serpentine du myéloblaste. Mieux vaut donc parler de modulations (225) que de dédifférenciation, de cellules fibroblastoïdes (fibroblast-like) épithélioïdes (épithelial-like) et recourir plutôt à des techniques histochimiques plus élaborées avant de décrire les cellules en culture.

LA CULTURE DE CELLULES SANGUINES

Bien des tentatives ont été faites depuis celle de Carrel et Burrows (42) pour cultiver du tissu hématopoïétique. Toutefois jusqu'ici personne n'a réussi même de manière approchée à garder indéfiniment et même pendant un certain temps du tissu médullaire par exemple, dans la forme où il a été explanté.

La difficulté principale réside sans doute dans le fait que les tissus hématopoïétiques sont faits de cellules diverses ayant des besoins nutritionnels variés qui obéissent à des stimuli différents et où multiplication et différenciation surviennent simultanément.

Il est pourtant intéressant de cultiver comme on le peut avec les méthodes actuelles les cellules normales et pathologiques capables de multiplication du sang, de la moelle, des ganglions, de la rate.

A court terme il est possible d'observer in vitro la multiplication et la différenciation de cellules sanguines qui restent très proches de ce qu'elles sont dans l'organisme. Mais à long terme les souches qu'ont obtenues quelques auteurs sont constituées de cellules très modifiées, ("altered", Parker 173), qu'elles proviennent de cellules normales ou pathologiques. Ces modifications sont extrêmement profondes, ces cellules prennent des caractères de malignité qui ne sont pas seulement morphologiques (monstruosités nucléaires et nucléolaires, nombre de chromosomes tout à fait aberrant) puisque leur injection à des animaux préparés et même à des sujets humains atteints de cancer et volontaires provoque la formation de tumeurs (152).

LES TECHNIQUES DE CULTURE DE CELLULES SANGUINES

Mentionnons tout d'abord les méthodes qui permettent l'observation microscopique des cellules pendant une période de quelques heures ou jours : il s'agit d'ailleurs plutôt de survie que de culture.

En plaçant une goutte de suspension cellulaire entre une lame et une lamelle, qu'on scelle à la paraffine on a des conditions optiques d'observation idéales mais la survie des cellules est limitée à quelques heures.

La technique de la goutte pendante permet de prolonger l'observation mais dans de bien plus mauvaises conditions optiques.

Avec un microscope inversé on peut étudier de façon satisfaisante une suspension cellulaire placée dans la chambre d'une lame à perforation cylindrique fermée de chaque côté par une lamelle.

Mais la méthode qui donne les préparations les meilleures du point de vue morphologie et survie est celle de Pulvertaft (185) : un petit bloc de gélose et de milieu nutritif est placé dans une chambre en perspex spéciale. la moelle est posée sur ce bloc, la chambre est fermée mais on peut y ajouter par des ouvertures latérales du milieu frais.

Mais les informations données par ces méthodes, quoiqu'utiles, sont limitées à la motilité, la vitesse de division, la phagocytose et jusqu'à un certain point aux processus de différenciation. On peut aussi étudier les réponses à certains stimuli (irradiations, produits chimiques) mais les observations ne peuvent être que morphologiques, aucun renseignement ne peut être tiré sur les processus métaboliques impliqués.

Les autres procédés peuvent être répartis en trois catégories à objectifs différents.

Ceux qui utilisent un caillot de plasma : les fragments tissulaires ou les cellules sont placés dans un caillot de plasma recouvert d'une phase gazeuse seule ou d'une couche de liquide nutritif (dans l'appareillage de Fieschi et Astaldi 69) et la technique du béchet à lamelle de

Berman (19). Mais les préparations sont souvent difficiles à lire si on les fixe telles quelles, la digestion du caillot par la trypsine (146) ne permet de faire que des étalements médiocre et il est impossible de compter le nombre absolu des cellules. De plus la charpente fibrineuse du caillot favorise la transformation fibroblastique des éléments médullaires : celle-ci est importante dès le deuxième jour. Cependant Astaldi et Mauri (9) ont utilisé cette méthode à côté d'autre pour étudier la maturation et prolifération des érythroblastes.

Bichel (26) a réussi à obtenir le premier une culture de cellules leucémiques au long cours en les faisant pousser en symbiose en goutte pendante avec des fibroblastes de poulet. Trois leucoses ont été ainsi cultivées par lui : une leucémie à cellules souches (leucémie de Krebs), une chloroleucémie fournie par Furth dont la pigmentation verte a disparu en culture et une leucémie à plasmocytes apparue spontanément chez une souris Ak. Après plusieurs mois les cellules continuaient d'être greffables à l'animal.

Mais c'est de Bruyn (53, 54) qui a eu la première culture de cellules leucémiques isolées : cependant au départ les cultures faites en caillot plasmatique, en tubes roulants comportaient des fibroblastes. Lorsque les fibroblastes ont été éliminés de certaines de ces cultures les cultures pures ne sont restées greffables que pendant quelques mois. Remarquons toutefois que ces cellules leucosiques provenaient de tumeurs leucosiques et non du sang ou de la moelle.

Utilisant au départ une méthode analogue Ball (14) a réussi à obtenir à partir de sang périphérique d'individus normaux des souches de cellules qui poussent depuis plusieurs mois in vitro. La couche de leucocytes ("buffy coat") obtenue par la sédimentation de 15 à 20 ml de sang en tube siliconé est mise en culture au sein d'un caillot de plasma dans un flacon conique suivant la méthode d'Allgöwer (6). Une semaine plus tard il ajoute un mélange de 80 % de milieu de Eagle et de 20 % de sérum de cheval ou de veau. Après un délai de quelques jours à plusieurs semaines le pH finit par tomber à 7, 0. Le surnageant est alors changé et dans 4 cas sur 5 on voit apparaître des colonies. Après trypsinisation les cellules d'allure fibroblastique peuvent être repiquées sur verre dans un milieu liquide. L' origine de ces cellules est vraisemblablement monocytaire.

Les cultures immobiles de suspensions cellulaires

constituent la deuxième catégorie de procédés. L'initiateur de la méthode a été Osgood, qui après avoir essayé un appareil extrêmement compliqué, véritable coeur, poumon rein artificiel (158, 159) en vint rapidement à mettre simplement la suspension dans un flacon cylindrique et étroit. L'avantage évident de cette méthode est la possibilité de faire des numérations de cellules précises et des étalements sur lesquels de bons examens cytologiques et cytochimiques peuvent être faits. Il observe (160) une multiplication des cellules dans les cultures de moelle normale et évalue la durée de vie des neutrophiles à 48, 90 heures, des éosinophiles à 8, 12 jours celle des basophiles à 12, 15 jours.

Israels avec une méthode dérivée de celle d'Osgood (100, 101) tente de suivre la maturation des cellules leucémiques.

En flacon de Carrel i.e. en couche mince les auteurs Italiens observent que le tissu érythropoïétique se différencie plutôt qu'il ne prolifère. (69, 10, 11).

Guntz (89, 90) étudie d'abord avec une méthode voisine de celle d'Osgood le devenir des cellules de leucémie myéloïde puis l'influence de l'irradiation et de l'aminoptérine. (in 118).

Lajtha et coll. (116, 117, 118) avec la même méthode étudient les modifications réversibles entre mégalo et normoblastes et les effets in vitro de l'acide folique, folinique et de la vitamine B 12. Lajtha entreprend ensuite de très belles études sur l'incorporation in vitro de métabolites radioactifs suivie par autoradiographie. En culture de moelle avec la même technique toujours il montre qu'il est possible d'étudier les chromosomes humains.

L'introduction de colchicine dans la culture bloque les mitoses en métaphase l'immersion des cellules dans une solution hypotonique citrique (79) provoque l'étalement des figures mitotiques qu'on augmente encore en écrasant avec une lamelle (squash). La coloration au Feulgen donne de très belles images chromosomiques.

Nous ne résistons pas au plaisir d'agrandir un peu cette parenthèse pour parler de ce qui nous parait être une magnifique découverte de la culture de tissus. En effet c'est grâce à elle que nos connaissances sur les chromosomes humains se sont précisées et qu'ont été décrites les premières maladies chromosomiques.

Jusqu'en 1956 en effet il est admis que les chromosomes sont au nombre de 48. Mais Tijo et Levan (213) démontrent qu'il n'y en a que 46 en recourant à des cultures en milieu colchiciné de poumons humains. Depuis lors de nombreux auteurs ont confirmé le fait (78, 25) et la description du caryotype normal est précisé. Mais surtout Lejeune, Turpin, Gauthier dans une série de publications (125, 126, 127, 128) démontrent que dans le mongolisme il existe un chromosome supplémentaire, ce que confirment Ford C.E. et Jacob P., et Brook I. tandis qu'il en manque un dans la polydysspondylie (84). De même le syndrome de Klinefelter parait correspondre à la formule XXY tandis que celui de Turner serait lié à la formule XO.

La notion de gradient : Cependant la culture de cellules sanguines va faire des progrès importants grâce à la découverte de la notion de gradient ("gradient factor") par Osgood (162). Il montre en effet que la densité de la population cellulaire et la hauteur du milieu de culture sont des facteurs importants pour la multiplication cellulaire, que ces deux facteurs ne peuvent être variés indépendamment si l'on veut réaliser les meilleures conditions de culture, et qu'ils varient en sens inverse l'un de l'autre. Autrement dit, d'une part on peut définir toute culture par son "gradient" qui est le produit de la densité cellulaire de la suspension de départ exprimée en milliers de cellules par mm3 et de la hauteur en cm. du milieu de culture et d'autre part comme le montre bien l'expérience suivante un gradient optimum peut être calculé pour chaque type cellulaire. Si l'on verse une suspension cellulaire dans une culture en gradient c'est-à-dire dans un flacon où se trouve une lame de verre inclinée à 45° les cellules sédimentent sur la lame en nombre croissant de haut en bas. Il y a donc un gradient continu le long de la lame d'une part pour le nombre des cellules, d'autre part pour la distance de la phase gazeuse. L'examen de la lame après quelques jours montre que pour chaque type de cellules il y a une profondeur optima de pousse qui dépend de la concentration initiale de la suspension cellulaire : les gradients favorables ont été calculés pour divers types de cellules :

TYPE	GRADIENT	
	Optimum	Etendue favorable
Cellules plasmocytaires	1,5	0,5 - 2,5
Cellules neutrophiles	3,5	1,5 - 6.
Cellules éosinophiles	4	0 - 8
Série monocytaire	4,5	I - 8
Série lymphocytaire	6,0	2 - 10
Série érythrocytaire	8	3,5 - 12

Non seulement au gradient voulu les cellules se multiplient activement mais encore elles gardent leur morphologie (ou du moins restent reconnaissables), leur caractéristiques métaboliques et cytochimiques (au moins en partie) et développent des colonies de structures particulières suivant le type cellulaire.

On se rend compte que le gradient définit une partie de microenvironnement cellulaire : la disponibilité en oxygène pour chaque cellule, la tension de CO_2 dépendent manifestement du gradient. Lorsque tous les facteurs qui composent l'atmosphère péricellulaire se révèlent favorables, on doit évidemment conserver aux cultures une immobilité aussi parfaite et prolongée que possible de manière à préserver l'équilibre qui s'est installé.

Les cultures de cellules sanguines suivant Osgood

C'est sur ces principes qu'Osgood et coll. ont réussi à isoler à partir de sang de sujets d'hémopathies malignes la plupart des types de cellules sanguines et à les maintenir en culture depuis plusieurs années.

Les techniques suivies peuvent être résumées ainsi. Le sang hépariné du malade est mis à sédimenter à + 4° jusqu'à ce que les hématies se soient déposées. On peut s'aider si cette sédimentation se fait mal d'une centrifugation à 1 000 tours/minute (38). Le plasma surnageant contenant les cellules nuclées est alors aspiré puis centrifugé 15 minutes à 1 500 tours. Le surnageant est éliminé tandis que le culot cellulaire est remis en suspension dans le milieu contenant 10 % de sérum précédemment décrit. Pour éliminer toute trace de fibrinogène on procède à un deuxième lavage puis on ajoute la quantité de milieu nécessaire pour obtenir une suspension contenant 1 000 cellules/mm3. On inocule alors le plus grandnombre possible de flacons à pharmacie plats d'environ 250 mg avec une quantité de suspension cellulaire qui permette de réaliser un gradient favorable pour le type cellulaire à isoler.

Si les flacons sont laissés immobiles les cultures ont plus de chances de réussir. Après un nombre variable de jours ou de semaines on constate à l'oeil nu l'apparition de colonies. Les variations de pH dictent alors le moment des changements de milieu.

On comprend mieux ce qui se passe lorsqu'on répartit la suspension dans des tubes inclinés à 15° contenant une lamelle rectangulaire de 12 x 60 mm. On échantillonne les divers tubes après 18, 24, 48 heures etc... L'examen des lamelles séchées à l'air puis colorées au Giemsa montre alors que certaines cellules à un endroit donné de la lamelle forment très vite des colonies microscopiques. Osgood a d'ailleurs proposé de s'aider de cette technique pour la classification des leucoses aigues (38).

Ainsi dans les leucoses monocytaires, les cellules à cytoplasme allongé avec une extrémité pointue et l'autre large à noyau elliptique se groupent en colonies à contours très irréguliers du fait de la migration des cellules. Dans les leucoses aigues granulocytaires au contraire les colonies sont à contours bien nets. Entre les colonies on observe généralement quelques cellules allongées probablement dérivés des quelques monocytes présents. Les colonies des leucoses aigues lymphocytaires ressemblent beaucoup aux précédentes mais on note parfois un groupement en cordons au sein de la colonie et des cellules en forme de miroir à main. Enfin les cellules plasmocytaires très étalées poussent en nappes lâches.

Cette méthode a d'ailleurs aussi fourni des souches au long cours.

Osgood et ses collaborateurs conservent 13 souches stables . J 96 et J 111 (163) ont été isolées du sang de malades atteints de leucoses aigues à monocytes. Les cellules qui y prédominent sont monocytaires et d'un polymorphisme extrême: elles prennent l'aspect de fibroblastes, d'histiocytes tissulaires ou de cellules réticulaires sont souvent multinuclées, ressemblent alors aux cellules de Sternberg. Mais d'autres types cellulaires y coexistent ; c'est ainsi que Leighton cultivant J 96 en éponge de cellulose observe la présence au centre d'une masse cellulaire de cellules érythrocytaires et que des tentatives d'obtenir des cultures à partir d'une seule cellule ont abouti à l'isolement des clones J 96 C 16 monocytaire et J 111 C1 dont les phosphatases alcalines témoignent de son caractère granulocytaire. J 128 obtenue d'un malade atteint de leucose myéloïde chronique contient surtout des cellules granulocytaires.

Les cultures suivantes n'ont été réussies qu'en recourant, par analogie avec les résultats obtenus auparavant par Bichel, de Bruyn et Puck (163), au mélange des cellules de malades à des cellules déjà bien établies in vitro. Ainsi ont été obtenues les souches lymphoïdes M 166 J 111 (leucose chronique) et J 169 J 128 (leucose aiguë) où les cellules sont d'allure lymphocytaire et se groupent, lorsque le gradient est adéquat, en chaînes comme dans la médullaire d'un ganglion, ou en colonies ressemblant aux follicules lymphatiques ; érythrocytaires J 173 J 111 (érythroleucose) et J 184B (culture de moelle érythroleucémique) où si une forte densité cellulaire est maintenue pendant 10, 15 jours on peut trouver occasionnellement des érythrocytes non nuclé et mettre en évidence par la coloration de Lepehne la production d'hémoglobine ;
plasmocytaire J 181 J 111 (leucose aiguë plasmocytaire) faite de cellules à noyau et cytoplasme caractéristiques. On peut trouver des inclusions qui se colorent en rouge et ressemblent au corps de Russell. Par contre on n'a pu retrouver in vitro la cryoglobuline présente dans le sérum du malade.

La souche J 182 J 111 C 1 provient d'un cas d'érythroleucose mais seule la lignée granulocytaire y est représentée. Enfin si la souche J 189 J 111 C1 venant d'une leucose subaiguë à basophile contient encore des cellules à grains basophiles, les grains éosinophiles ont disparu de J 185 J 111 C1 qui provient d'une leucose myéloïde chronique à éosinophiles.
Toutes ces souches sont d'un entretien facile : elles sont gardées dans des flacons à pharmacie de 250ml avec 10ml de milieu. Pour changer le milieu, après agitation des flacons le liquide est décanté et remplacé par du milieu frais. Pour faire des repiquages, le surnageant est écarté, remplacé par 9ml de milieu et 1ml d'une solution d'EDTA à 1,5%. après incubation et agitation vigoureuse la suspension cellulaire est répartie entre

6 nouveaux flacons où l'addition de milieu frais fait cesser les effets de l'EDTA. La trypsinisation de ces cellules est possible mais ne donne pas d'aussi bons résultats.

Avec le temps ces cellules se sont beaucoup modifiées;elles ont pris des caractères malins extrêmement nets et leur karyotype est monstrueux. D'autre part et sans doute parce que la plupart du temps elles sont soumises à un gradient bas, la sélection a joué et leur gradient optimum s'est abaissé considérablement comme nous le verrons dans nos expériences.

L'intérêt de disposer de ces souches, si modifiées soient-elles, est évident: insistons seulement sur les processus de différenciation qui surviennent indiscutablement dans ces cultures.

Cultures en suspension agitée : Etant donné ce qui vient d'être dit du gradient on comprend qu'il doit être bien difficile d'isoler des souches cellulaires sanguines, nouvelles dans un milieu agité (tubes roulants à grande vitesse, (59, 175), agitateur magnétique, agitateur rotatoire du type Brunswick). Par contre ces méthodes peuvent être appliquées aux cultures déjà isolées depuis un certain temps : ainsi peut-on obtenir d'énormes quantités de cellules. Certains auteurs utilisent même dans ce but des récipients à fermentation de 5 litres (141) et des "cytostats" (175) où un système automatique, à intervalles calculés, ajoute un certain volume de milieu et retire un égal volume de suspension cellulaire.

Les autres souches d'origine sanguine en culture au long cours :

D'autres souches ont été établies de façon permanente en culture. Citons les souches d'origine humaine de Berman, isolées à partir du sang ou de la moelle de sujets normaux ou leucémiques, les souches MCN de Mc Culloch, Parker et la souche lymphoblastique de souris L5178 de Fischer (74) qui pense avoir réussi grâce à l'addition de gluthation, d'acide ascorbique d'acide folique en grosses quantités et de peptones.

On peut espérer en recourant aux techniques de Puck (184) obtenir plus de succès dans l'avenir.

Avant d'en finir avec les cultures de tissus sanguins mentionnons encore trois types spéciaux de culture :

les cultures de ganglions lymphatiques entiers de Trowell qui sont faites sur un milieu demi-solide (216) ou sur un fin grillage de tantale affleurant le milieu de culture ;

les cultures de moelle de Reisner (187) qui isole un fragment de

moelle sous un fin grillage de tantale au fond d'une chambre de culture en forme de puits ;

enfin les études d'Algire (294) sur le transfert cellulaire des produits immunologiques grâce à l'implantation de chambres de diffusion in vivo.

CHAPITRE DEUXIEME

AUTORADIOGRAPHIE

D E F I N I T I O N

Grâce aux isotopes de nombreux chapitres de biologie ont été renouvelés. Les corps radioactifs notamment se sont montrés d'une grande utilité ; les radiations ionisantes que ceux-ci émettent sont capables d'impressionner une émulsion photographique, c'est d'ailleurs cette propriété qui a mené à leur découverte. L'image ainsi obtenue qu'on appelle autoradiographie permet de localiser la substance radioactive.

Avec les progrès de la technique autoradiographique on peut maintenant suivre certains isotopes, le tritium notamment jusqu'au niveau des organites intracellulaires et y mettre en évidence la présence de quelques atomes radioactifs. Les noms d'histoautoradiographie, de microautoradiographie, de cytoautoradiographie ont été proposés. Nous nous contenterons du terme autoradiographie. L'utilisation quantitative de l'autoradiographie est possible mais elle pose des problèmes pratiques et théoriques difficiles.

LES PROGRES DE L'AUTORADIOGRAPHIE

Si en 1867 Niepce de Saint Victor (in 47) constate qu'une plaque photographique a été voilée à proximité d'un sel d'uranium, il attribue ce phénomène à la fluorescence et l'on peut dire que c'est Becquerel qui fait la première autoradiographie.

Roentgen venait de montrer que les rayons X qui sortent d'une ampoule en la rendant fluorescente à leur point d'émergence avaient un pouvoir de pénétration remarquable et impressionnaient fortement les plasques photographiques. Becquerel cherche à étendre cette propriété aux substances rendues fluorescentes par la lumière solaire. Mais il observe que, sans qu'ils aient été rendus fluorescents des cristaux de sulfate de potassium et d'uranyle, placés au contact d'une couche photographique enveloppée de papier opaque, y dessinent leur silhouette. (1896). Le phénomène lui apparaît comme une conséquence d'une propriété de l'élément ; l'histoire de la radioactivité commence, en même temps que celle de l'autoradiographie.

La première utilisation de l'autoradiographie est industrielle : on s'en sert pour localiser la radioactivité dans des minerais (in 226).

Ses premières applications à la biologie remontent à 1904. London (137) à St. Petersbourg place une grenouille dans un récipient et l'expose à l'éménation du radium. La silhouette de l'animal, placé sur une plaque photographique s'y dessine. Dès la même année Bouchard, Curie et Balthazard (31) étudient la répartition de l'émanation du radium, absorbée par inhalation, dans les divers tissus du cobaye.

Lazarus, cité par Lacassagne (109) injecte de l'actinum X à des animaux et cherche à obtenir les images des rayonnements bêta et gamma qui traversent les téguments (1912).

Kotzareff propose le nom de radiumgraphies ou de curiegraphies pour les documents qu'il obtient après injection par voie générale de solutions d'émanations du radium chez des animaux et par injection directe chez une femme, dans une métastase abdominale de cancer du col (103).

En 1924, Lacassagne et Mme Lattès apportent dans une série de publications (109, 110, 111) les "autohistoradiographies" des divers organes de lapins qui ont reçu des injections de polonium. Ils incluent les organes dans la paraffine, préparent des coupes et appliquent la surface plane du restant du bloc sur une plaque photographique : ils obtiennent ainsi, grâce à l'action des particules alpha du polonium, "de véritables autoradiographies des organes, d'une remarquable netteté mettant en évidence non seulement le degré de rétention du polonium mais encore les points au niveau desquels le corps a été fixé. L'examen histologiques des coupes colorées en comparaison avec les clichés permet d'identifier avec précision le siège de la localisation du polonium et d'étudier les lésions locales déterminées à ce niveau par son rayonnement.

Lomholt en 1930 applique étroitement des coupes histologiques sur des plaques et les sépare plus tard pour colorer les unes, développer les autres. Il peut comparer ainsi l'autoradiographie et la section même qui a été autoradiographié (136).

Les premières autoradiographies obtenues avec des isotopes artificiels sont faites en 1938 (88). Bulliard, Grundland et Moussa font les premières autoradiographies biologiques avec les isotopes artificiels : ils étudient les phosphatides surrénaliens avec du P32. En 1940 avec le procédé de Lomholt, Hamilton réalise les premières autoradiographies de la thyroïde à l'I 131 (91) et l'intérêt des biologistes pour la méthode encore peu satisfaisante s'accroit.

Un pas décisif va être accompli par Leblond et Belanger (16). Faisant fondre l'émulsion d'une plaque ils en étalent au pinceau quelques gouttes directement sur la préparation histologique : ils développent ainsi la première méthode qui permet d'observer simultanément au microscope, l'autoradiographie et la section histologique correspondante.

De multiples progrès ont été accomplis depuis, qui font de l'autoradiographie une technique bien au point. On peut choisir entre un grand nombre d'émulsions suivant le type de la préparation histologique, l'isotope utilisé, etc... D'autres procédés ont été imaginés. A part les méthodes d'apposition de Lomholt, Hamilton et de recouvrement par émulsion liquéfiée de Leblond et Belanger que nous venons de citer, les principales méthodes en usage sont celles de montage de Endicott et Yagoda (60), de Evans (62) où la préparation est montée directement et de façon perma-

nente sur une plaque autoradiographique et celles, qui recourent à une émulsion pelliculable "stripping film", "stripping plate" suivant l'idée introduite par Pelc en 1947 (176). Nous décrirons un peu plus loin ces diverses méthodes en nous attachant aux seules qui soient capables d'enregistrer les émissions béta du tritium : ce sont celles qui recourent aux émulsions liquéfiées et aux émulsions pelliculables. Ce sont les émulsions pelliculables que nous avons utilisées dans nos expériences.

FONCTIONNEMENT DES EMULSIONS NUCLEAIRES

Comme les émulsions photographiques ou radiographiques, les "émulsions nucléaires" sont faites essentiellement d'une suspension de micro cristaux d'halogénures d'argent (bromure en fait presque exclusivement) dans un gel de gélatine. Mais le nombre de ces micro cristaux peut y être infiniment plus grand (10 par micron cube) et leur diamètre infiniment plus petit (2/10 de micron) et plus régulier.

Que se passe-t-il quand une photographie ou (une autoradiographie) est prise, "exposée", et développée ? En fait le fonctionnement de ce matériel, quoiqu'il ait été merveilleusement perfectionné reste quelque peu mystérieux (103). Il existe cependant un ensemble d'hypothèses au total satisfaisant.

L'autoradiographie en biologie étudie surtout les particules bêta des isotopes radioactifs. Supposons donc qu'une particule bêta, un électron nucléaire, résultant de la désintégration d'un atome de H 3 ou de C 14 ou de P 32 pénètre dans une émulsion.

EXPOSITION ET FORMATION DE L'IMAGE LATENTE ;

Cet électron va "activer" un ou plusieurs cristaux : ces "grains exposés" vont être le siège de la formation d'une image latente et le développement photographique va les transformer en grains d'argent visibles. On On peut se représenter ainsi la suite des évènements : du passage de la particule bêta résulte la formation d'ions^{+} et d'électrons e-. Mais les cristaux de bromure d'Ag. ne sont pas parfaits ; on s'arrange d'ailleurs,

lors de la fabrication des émulsions, pour leur ajouter volontairement des imperfections ; celles-ci consistent dans le rassemblement en certains points de la surface ou de l'intérieur du cristal, de plusieurs molécules de sulfure d'Ag., d'atomes d'Ag. (Sheppard, Trivelli et Loveland, in 103). Ces imperfections constituent des points sensibles (sensitivity specks) et vont fonctionner comme des pièges à électrons : tous les électrons libérés par la particule ionisante s'y précipitent (Webb, 103). L'atmosphère électrostatique négative ainsi formée en ces points attire un certain nombre d'ions $Ag.^+$ ceux qu'on sait exister dans les mailles du réseau cristallin où ils sont mobiles (Gurney et Mott, 103). A leur arrivée en ces points les ions $Ag.^+$ sont réduits par les électrons en atomes d'argent. Macroscopiquement ces grains ne sont pas modifiés, pourtant ils sont devenus particuliers : ils sont le siège d'une image latente.

DEVELOPPEMENT

Le développement va faire la différence entre ces grains exposés et les autres en ne "révélant" que les premiers : le réducteur utilisé ne transforme rapidement les ions $Ag.^+$ du réseau cristallin en Ag. métallique que dans les cristaux où des atomes d'argent se sont condensés aux points de sensibilité, ou germes.

Sheppard (103) avait observé que le sulfite de sodium en solution réagit avec le nitrate d'Ag. en donnant un précipité d'Ag. métallique suivant une réaction d'abord lente puis qui s'accèlère avec le temps et avait démontré que c'est la présence de l'argent lui-même qui accélère la réaction.

Par analogie il émet alors l'hypothèse suivante : l'agent développant serait absorbé à la surface des grains de Br Ag et se combinerait aux ions Ag en formant un ion complexe qui se décomposerait alors en Ag métallique. Cette réaction se produirait pour tous les cristaux si le temps de contact avec le réducteur était assez long, mais les atomes d'argent déjà présents dans les grains exposés accélèreraient cette réaction et ceux-ci se développeraient beaucoup plus vite : pour un temps convenable de développement seuls les grains exposés sont révélés. Mais un autre point doit être ici noté : si le grain développé apparaît massif au microscope ordinaire, en fait le microscope électronique révèle qu'il a une structure chevelue, filamenteuse. Il semble que l'argent métallique se dépose sur le cristal et autour de lui, au fur et à mesure qu'il est précipité sous la forme de filaments d'Ag colloïdal : ainsi le diamètre d'un cristal de 0,2 micron passe-t-il après exposition à 1 micron.

POTENTIEL D'IMAGE LATENTE

Mais il n'y a pas après l'exposition que deux sortes de grains, ceux à image latente, ceux sans image latente. Les images latentes sont en effet plus ou moins fortes : si un grain est parcouru par une particule bêta de très haute énergie, i.e. d'ionisation spécifique faible peu de paires d'ions y sont formées et finalement peu d'atomes d'argent se déposent aux points de sensibilité. Au fur et à mesure de son parcours la particule bêta perd de son énergie, elle provoque dans les cristaux qu'elle traverse alors la formation de plus en plus de paires d'ions et donc le dépôt de plus en plus d'atomes d'Ag. Le "potentiel d'image latente" des différents grains s'accroit progressivement.

Pour un temps de développement très bref, seuls les grains ayant le potentiel le plus élevé qu'il soit possible d'atteindre acquièrent la taille maxima possible ; les grains ayant un potentiel moins élevé n'arrivent pas à la taille maxima mais restent visibles. En descendant l'échelle des potentiels on parvient à des grains à image latente faible, qui ont été développés partiellement mais n'ont pas atteint la taille nécessaire pour devenir visibles. Lorsqu'on augmente progressivement le temps de développement on augmente également le nombre des grains à taille maxima et de ceux atteignant le seuil de visibilité. Il arrive un moment où non seulement on fait apparaitre les grains exposés à la radiation mais encore ceux qui avaient pour des raisons diverses un potentiel d'image latente non nul : le voile de fond (background devient trop important. A la limite d'ailleurs tous les grains peuvent être développés.

Le temps de développement a donc une valeur critique qui dépend de la sensibilité de l'émulsion utilisée de l'isotope, du but de l'expérience etc...

FIXATION

La fixation consiste ensuite à éliminer de l'émulsion tous les cristaux qui n'ont pas été exposés et développés : le bromure d'argent n'est que peu soluble dans l'eau mais l'ion hyposulfite du fixateur forme avec l'ion argent un ion complexe très soluble, tandis qu'il ne solubilise pour ainsi dire pas l'argent métallique. Après un bain d'hyposulfite un lavage à l'eau ne laisse dans l'émulsion que les grains d'argent sur un fond transparent.

LES EMULSIONS COMMERCIALES

Les physiciens et les chimistes ont réussi à fournir des émulsions dont la sensibilité permet d'enregistrer tous les effets de telle ou telle radiation ionisante et de ne pas inscrire les traces inopportunes des autres radiations. Ces émulsions diffèrent par la taille de leurs grains, leur densité en grains, leur épaisseur, les sensibilisateurs (97) qui y sont inclus. D'autre part elles sont disponibles sous différentes formes. La couche sensible peut être :

1 - fixée sur une plaque de verre et destinée soit à être utilisée telle quelle, soit à en être détachée pour être appliquée sur la préparation (plaques pelliculables, stripping plates), soit enfin à être fondue et étalée sur la préparation.

2 - fixée temporairement sur un film d'ester de cellulose (stripping film).

3 - sans support, en couche solidifiée ou en flacon.

LES IMAGES AUTORADIOGRAPHIQUES

Les traces (tracks) disposées dans l'émulsion sur le parcours des particules alpha sont rectilignes. Au contraire les électrons de haute énergie vont dans l'émulsion suivant des lignes brisées totalement irrégulières et il est rare qu'on puisse les reconnaitre en tant que traces caractérisées par une plus grande densité des grains à leur terminaison : on ne voit habituellement que des grains disposés au hasard.

Autant dire qu'il est possible de localiser de façon satisfaisante le point d'où est parti une particule alpha, mais que c'est impossible pour une particule bêta du P. 32. D'autant plus que son parcours dans l'émulsion est très long (1,4 mm pour les particules ayant l'énergie maxima, 1,7 Mev. La résolution dans ce cas est très mauvaise i.e. qu'il est impossible de déparer deux point émetteurs même très éloignés. Les parcours se raccourcissent pour l'I 131 : 200 microns au maximum, pour le C 14 : 20 microns (87), mais avec le tritium on peut avoir une résolution très satisfaisante. En effet l'énergie maxima des électrons de H 3 est de 17,9 kev ; ce qui leur assure un parcours maximum de 6 microns dans un milieu de densité 1 i.e. de 2 microns environ dans les émulsions nucléaires. Encore l'énergie moyenne des particules bêta du tritium est-elle bien inférieure (environ 6 kev.) avec un parcours dans l'émulsion de l'ordre de 1 micron. Le plus souvent une particule bêta n'active qu'un grain ; rarement deux . Mais l'isotope n'est pas le seul facteur qui joue dans la résolution. La minceur de la préparation, celle de l'émulsion sont très importantes. De même l'espace entre la préparation et l'émulsion doit être réduit au minimum. Pour le tritium il faut noter que : si la préparation est trop épaisse la plupart des particules émises en profondeur n'arrivent même pas jusqu'à l'émulsion, la trop grande épaisseur de l'émulsion a le désavantage d'augmenter le voile de fond et qu'il est

impossible de laisser le moindre intervalle entre l'émulsion et la préparation. De ce fait il résulte des difficultés de coloration : il n'est possible en effet de colorer le spécimen avant d'appliquer l'émulsion que si on intercale entre les deux une couche imperméable de celloïdine par exemple. Celle-ci empêche les colorants de venir agir chimiquement sur l'émulsion et d'autre part elle protège les colorants de l'action des produits chimiques lors du développement.

On colore donc après le développement mais on est limité par les réactions du colorant sur la gélatine (coloration ou opacification de celle-ci, précipitations gênantes). Nous verrons par exemple à quelle solution nous nous sommes adressés pour colorer les chromosomes.

LES ARTEFACTS

Nous venons de voir que les colorants pouvaient produire des artefacts. Il est d'autres causes d'artéfacts et d'autres sources d'erreurs. Voyons-en quelques unes dans leur ordre d'apparition possible au cours de la préparation des autoradiographies.

Lors de la fixation : L'isotope s'il est sous forme soluble risque de se dissoudre. On devra donc peser soigneusement ce pas et dans de nombreux cas s'adresser à la technique du freeze-drying.

Lors de la préparation de l'émulsion :

1 - Il existe dans l'émulsion un voile de fond préexistant. Il est parfois possible de s'en débarrasser (2).

2 - Dans le cas des émulsions pelliculables (stripping), il faut qu'elles soient à un degré voulu d'humidité, sinon lorsqu'on les décolle se produisent des décharges électrostatiques, souvent accompagnées d'éclairs de lumière, capables d'activer des grains. Il est bon de travailler dans une atmosphère relativement humide ou de relier l'émulsion ou l'opérateur à la terre par un fil de cuivre (in 32).

3 - La pression d'un doigt, le glissement d'un instrument sur l'émulsion laissent leur trace.

4 - Il faut évidemment éviter l'exposition à la lumière et réduire au minimum, même l'exposition à la lumière rouge.

Lors de l'exposition : De très nombreux produits chimiques (226) risquent d'agir sur l'émulsion : ils peuvent être contenus dans le tissu lui-même (glutathion) d'où l'intérêt chaque fois que c'est possible de placer une couche protectrice entre l'émulsion et le spécimen.

Leurs actions peuvent consister en : production d'images latentes, disparition d'images latentes (fading) sensibilisation, désensibilisation.

Lors du développement et de la coloration l'émulsion risque de se déplacer par rapport à la préparation, en masse ou seulement dans certaines aires. Le développement peut être inégal si on n'agite pas constamment : certains colorants solubilisant les grains d'argent etc.... (32)

LES PRINCIPAUX PROCEDES PRATIQUES

LA METHODE D'APPOSITION

Nous en avons déjà vu le principe : on place la préparation portée sur une lame au contact d'une émulsion qui recouvre une lame identique. On aligne exactement les deux lames et on les maintient en contact serré, par des clips, durant l'exposition. On les sépare ensuite pour développer l'autoradiographie et colorer la coupe. C'est une technique simple mais grossière. Il est difficile de réaligner les deux lames pour l'observation à de forts grossissements.

LA METHODE DE MONTAGE

La coupe histologique, incluse dans la paraffine est montée directement sur l'émulsion d'une plaque de verre de la façon suivante : la coupe est mise à flotter sur un bain d'eau à 40°, pour la débarrasser des rides provoquées par la section, puis transférée dans un bain à 18,20°. La plaque photographique est alors glissée au-dessous et on "pêche" la coupe. Lors du séchage l'adhérence devient forte. Après l'exposition on déparaffine, puis on développe et l'on colore. La résolution avec ce procédé est bonne, approche souvent le niveau cellulaire.

On peut combiner les deux méthodes précédentes ("sandwich" de Fitzgerald 77).

METHODE DE REVETEMENT PAR EMULSION LIQUIDE

Les préparations sont recouvertes d'émulsion liquéfiée qu'on étale au pinceau (16) ou avec une lamelle comme pour faire un étalemert de sang (207). Ou bien les lames sont trempées dans l'émulsion (104).

On peut contrôler dans les deux premiers procédés, en variant la quantité d'émulsion utilisée, l'épaisseur de la couche couvrante. Dans les trois procédés on peut diluer l'émulsion suivant la résulution désirée.

Les émulsions qu'on utilise se présentent en falcon (gels) ou sont fondues après détachement de leur support (verre ou film).

Trois variantes sont à décrire. Bélanger (17, 18) recourt à "l'inversion" pour éviter la perte des produits radioactifs solubles. Gomberg (85) fabrique l'émulsion peut-on dire, directement sur la préparation : il applique sur elle une couche de collodion contenant des bromures et l'immerge pendant l'exposition dans un bain de nitrate d'argent. Il se forme ainsi une couche sensible d'environ 1 micron juste à la surface du spécimen. Ceccaldi (48) propose même d'imprégner d'halogénure d'argent la matière organique même du tissu, celle-ci jouant par ses protéines et ses polymuco saccharides un rôle analogue à celui de la gélatine.

METHODES UTILISANT UNE EMULSION PELLICULABLE (Stripping film)

Imaginées par Pelc (176) elles donnent les meilleurs résultats. Le principe en est le suivant : la fine couche d'émulsion est décollée au moment de l'usage, mise à flotter sur l'eau dont elle s'imbibe. Elle est alors pêchée en passant la préparation histologique sous elle. Lors du séchage elle s'applique étroitement sur le tissu.

L'émulsion d'une épaisseur de 4 ou 5 microns fait corps ici avec une base de soutien de gélatine de 10 microns d'épaisseur. Celle-ci est perméable. L'ensemble est donc passé dans les bains lors du développement et la coloration est effectuée au travers de l'émulsion. Nous décrirons plus loin la technique suivie dans nos expériences.

Boyd et Williams d'une part (33), Mac Donald et collaborateurs d'autre

part (140) utilisent des émulsions pelliculables dont la base, en ester de cellulose est imperméable. On applique donc l'émulsion sur une préparation déjà colorée (33) sinon il faut procéder à l'inversion (140).

Il faut noter ici que seules les émulsions pelliculables Kodak Limited (Angleterre) ont pu être appliquées directement sur des étalements de sang humain ou de souris leucosiques ou normaux sans donner de pseudo-images autoradiographiques (33, 77).

L'AUTORADIOGRAPHIE QUANTITATIVE

Il est certes possible de compter visuellement les grains (130) ou de recourir à une instrumentation faisant le travail automatiquement (214).

Au niveau cellulaire il n'y a guère que le premier procédé qui soit utilisable (178). Mais c'est un travail très long et fastidieux. Encore faut-il des préparations parfaites avec 25, 30 grains au-dessus de chaque cellule (178), avec un voile de fond réduit au minimum et une coloration histologique légère.

Ces données quantitatives peuvent permettre, grâce à une analyse mathématique fort compliquée (156) de connaitre par exemple la quantité d'ADN formée par minute par cellule, la dose de rayonnement infligée par le traceur à la cellule marquée etc... Mais ces résultats ne peuvent être que très approximatifs ne serait-ce que par la variabilité des émulsions fournies même au cours d'une seule livraison, la variabilité des produits de développement, ou par la distance variable où se trouvent les atomes radioactifs dans l'épaisseur des coupes ou des étalements par rapport à l'émulsion.

PREVISION D'UNE EXPERIENCE

Tant de variables interviennent : émission et durée de vie de l'isotope, durée de l'expérience, recherche d'un résultat qualitatif ou quantitatif, nécessité d'avoir des images denses ou faites de quelques grains, d'avoir une résolution très fine ou non, que toute expérience autoradiographique nécessite un "planning" spécial.

Une fois l'isotope et les émulsions utilisables choisis, restent à déterminer entre autres : la dose et l'activité spécifique du traceur, le temps d'incorporation, la fixation histologique, la durée d'exposition, les temps de développement et de fixation, les durées des colorations. C'est dire que bien souvent des expériences préliminaires sont nécessaires.

De toute manière il faut tenir compte du rôle possible des radiations délivrées aux cellules par l'isotope (170).

QUELQUES TRAVAUX AUTORADIOGRAPHIQUES

L'autoradiographie a permis et permet d'étudier un nombre immense de questions dans les disciplines biologiques les plus diverses : embryologie, microbiologie et virologie, métabolisme de l'os, de la dent, des glandes endocrines, du rein, devenir des greffes, immunologie etc...

En hématologie l'autoradiographie est surtout intéressante comme nous le verrons plus loin pour l'étude de la multiplication cellulaire, mais Lajtha a pu apporter quelques démonstrations intéressantes.

En culture de moelle il a montré que l'incorporation du Fe 59 dans l'hémine est reconnaissable dès le stade du proérythroblaste, atteint son maximum de vitesse avec les érythroblastes basophiles et polychromatophiles jeunes puis diminue progressivement jusqu'au réticulocyte. Les mêmes faits ont été retrouvés in vivo chez le lapin. De plus il a pu établir que l'irradiation des normoblastes par 1 000, 5 000 rads ne modifie pas l'incorporation du Fe 59 (114, 115). Il a établi aussi (in 118) que les promyélocytes et les myélocytes sont les seules cellules à incorporer du S 35 (sulfate ou méthionine) : les investigations histochimiques ont prouvé que le corps formé avait certaines propriétés de l'acide chondroïtine sulfurique mais n'en était pas.

L'incorporation de sulfate par les mégacaryocytes peut aussi permettre d'étudier la survie et la production des plaquettes (in 118).

CHAPITRE TROISIEME

METABOLISME DE L'ACIDE DESOXYRIBONUCLEIQUE

THYMIDINE TRITIEE

En 1868 Mischer isole la nucléine et en quelques années montre qu'il s'agit d'un complexe acide polybasique et phosphoré de haut poids moléculaire.
Altman purifie la nucléine et introduit le terme d'acide nucléique. Les composants basiques sont tous identifiés en 1903, le désoxyribose est reconnu en 1929.

A ce moment l'on distingue l'acide nucléique de levure ou zymonucléique ou phytonucléique, celui du thymus ou thymonucléique. Grâce surtout à l'histochimie on sait maintenant que le premier : l'acide ribonucléique ARN n'est pas spécifique du règne végétal et qu'il est localisé essentiellement dans le nucléole et certaines structures cytoplasmiques tandis que le deuxième : l'acide désoxyribonucléique, ADN n'est pas spécifique du règne animal mais localisé uniquement dans le noyau et plus précisément dans la chromatine du noyau au repos où les chromosomes à la mitose.

En 1930 la seule fonction qu'on peut suggérer pour l'ADN est celle d'un

tampon de pH intranucléaire (in 34). La reconnaissance du rôle génétique de l'ADN ne vint que beaucoup plus tard, (12) et d'une spécialité, la microbiologie , plutôt inattendue lorsqu'on se rappelle qu'en 1930 les bactéries sont sensées ne contenir ni noyau ni gênes.

Dès lors d'innombrables études sont consacrées à l'ADN qui aboutissent aux schémas suivants du cycle mitotique. La quantité d'ADN, qui est la même pour toutes les cellules d'un organisme, double dans la chromatine des noyaux un certain temps avant la division. Cet ADN est stable, n'a pas de turnover et n'augmente qu'en vue d'une nouvelle division.

Voyons d'abord ce qu'étaient nos connaissances sur ces différents points avant l'introduction de la thymidine tritiée.

La constance du contenu en ADN est un problème très débattu. Boivin et coll. (28) proposent l'idée que si l'ADN est le principal constituant génétique des noyaux et si ceux-ci contiennent les mêmes gênes dans toutes les cellules d'un organisme donné, il s'ensuit que le contenu en ADN par cellule doit être constant. Mais des cytogénéticiens Sengün (200), Breuer et Pavan (37) doutent que les chromosomes aient toujours exactement la même morphologie et la même composition dans un organisme et même dans un seul organe et en fait il semblerait que dès avant le stade de neurula les noyaux commencent à différer les uns des autres dans les diverses régions de l'embryon.
Si Vendrely R. et Vendrely C. (219) trouvent que l'ADN des noyaux des cellules hépatiques est approximativement le double de l'ADN des spermatozoïdes, si de nombreux auteurs le confirment (Frazer et Davidson (80) suggèrent même que le contenu en ADN pourrait être utilisé dans les travaux biochimiques comme un index du nombre de cellules), des difficultés s'élèvent toutefois quand on estime l'ADN par cytophotométrie après coloration de Feulgen (Pollister et Ris, Lison et Pasteels etc ...) sur des noyaux considérés individuellement et non sur une population mélangée de noyaux.

Si nombre d'auteurs : Mirsky et Ris, Thomson et Frazer, Alfert et Swift, Walker et Yates etc ... continuent de penser que le contenu en ADN est lié directement au degré de ploïdie du noyau, d'autres trouvent des valeurs trop dispersées pour être expliquées par des variations de ploïdie (Pasteels et Lison 174, Fautrez et Fautrez-Firlefyn 65, Roels 193, etc ....)

S'agit-il d'insuffisance de l'instrumentation (3) ou d'une variation du contenu en ADN en rapport par exemple avec l'activité physiologique du tissu (112, 138) le problème reste en suspens mais il semble bien qu'on peut admettre que l'ADN a une stabilité très remarquable, comme les gênes.

L A T H Y M I D I N E T R I T I E E

Parmi les substances les plus utilisées dans l'étude de l'ADN par autoradiographie notamment, figurant le P 32, l'adénine-8-C 14 et le formate C 14 de sodium mais ces substances sont incorporées dans d'autres molécules (ARN notamment) qu'il faut d'abord éliminer.

La thymidine tritiée synthétisée depuis 1955 (in 51) a plusieurs avantages.
La thymidine, quoique ce ne soit pas un précurseur physiologique de l'ADN en ce sens que le monophosphate de thymidine phosphorylé ultérieurement en triphosphate de thymidine ne procède pas de la phosphorylation de la thymidine mais de la méthylation du monophosphate de désoxyuridine (82), entre facilement dans le cycle synthétique et n'est utilisée dans aucune autre synthèse, comme l'ont montré chimiquement Reichard et Estborn (186) et Friedkin et coll. (81). On a montré également que l'action de la désoxyribonucléase sur des cellules ayant incorporé de la thymidine tritiée fait disparaître toute trace de radioactivité (7) . Les seules exceptions à cette règle sont l'incorporation de thymidine tritiée dans le corps parabasal, élément Feulgen positif, des trypanosomes en culture (201) et l'apparition autour des plaquettes vitellines des ovocytes de grillons d'une radioactivité résistant à la désoxyribonucléase.

On a pu se demander toutefois si l'introduction de thymidine ne risquait pas d'activer la synthèse de l'ADN la réponse est négative (Friedkin).

Grâce au tritium qu'elle comporte comme traceur il est possible d'en retrouver quelques molécules au sein de l'ADN néoformé et de localiser celui-ci par autoradiographie au stripping film dans tel ou tel chromosome.

Cependant une résolution aussi parfaite n'est pas nécessaire à tous les travaux et Lajtha pense que dans de nombreux cas la thymidine au C 14 fabriquée jusqu'ici en beaucoup plus petite quantité, serait préférable (119).

Nous avons déjà vu que des doutes avaient été émis sur la stabilité de l'ADN dans les cellules qui ne se divisent pas. Qu'apporte la thymidine tritiée à cette discussion. Il semble finalement que son incorporation ne survient que lors de la préparation à la mitose (à moins que la cellule ne devienne polyphoïde ou polyténique). Ceci signifie qu'il n'y a synthèse de l'ADN qu'en vue de la mitose et aussi qu'il n'y a pas d'échange dans la molécule de l'ADN.

Les plus récentes critiques à ces affirmations sont les suivantes : Pelc (177) et Koenig (107) ont observé l'incorporation de C 14 dans l'ADN des noyaux de vésicules séminales de souris et du névraxe de chat, respectivement. Or les cellules de ces deux organes étaient supposés ne pas se diviser. Mais Leblond a montré que d'une part la colchicine mettait en évidence la présence de mitoses dans les vésicules séminales de souris (discussion de 135) et que de nouvelles cellules se formaient dans le lobe olfactif, par exemple, de la souris (150, 99) Le groupe de Kornberg qui vient de réussir la synthèse de l'ADN (121, 22) n'a pu mettre en évidence de réactions d'échanges (in 99).

Si Plaut et Mazia (180) avec le C 14 comme marqueur, en raison du risque de modifications par radiations dues au tritium (181) arrivent à des conclusions différentes, de même que La Cour et Pelc (113), Taylor utilisant les observations autoradiographiques faites sur diverses plantes avec de la thymidine tritiée et de la colchicine et un grand nombre d'autres données est parvenu à esquisser dans une succession d'articles une image claire de ce qui se passe au niveau des chromosomes (208, 210) en ce qui concerne la synthèse de l'ADN et la répartition des ADN ancien et néoformé lors de la division. Sa conception a le mérite (211) de s'accorder au mieux avec le schéma de la molécule d'ADN proposé par Watson et Crick (223) et les connaissances actuelles en génétique.

Dans l'étude des proliférations cellulaires il semble bien qu'on peut admettre le schéma suivant : une cellule qui ne se divise pas, n'incorpore pas de thymidine tritiée, une cellule qui va se diviser l'incorpore dans l'ADN néoformé et le marqueur est également réparti dans les cellules filles.

Lajtha (114, 118) en culture de moelle fraîche in vitro a bien montré ce qui se passe entre deux mitoses : il y a d'abord une période de repos G 1 relativement longue puis une période de synthèse de l'ADN de durée moindre et enfin un repos prémitotique court G 2.

ETUDES HEMATOLOGIQUES

Toute une série de travaux mettant à profit ces propriétés de la thymidine tritiée, sont en cours dans le monde.

Le groupe de Brookhaven contribue largement à ces études et à notre connaissance a été le seul à utiliser la thymidine tritiée chez l'homme: en effet si le tritium était administré sous forme d'eau tritiée ses dangers seraient à peu près nuls mais la thymidine va, elle, concentrer ses effets dans les cellules qui se renouvellent et notamment dans les cellules germinales et même si les expériences sur les mammifères n'ont pas jusqu'ici montré de troubles de la spermatogénèse, d'induction de malformations embryologiques ni de néoplasmes, les altérations cellulaires en culture de tissus obligent à penser (142) qu'il est sage de n'en administrer qu'à des patients tels que ceux de Cronkite (51) atteints de cancers très évolués et surement incapables de procréer.

Chez l'homme ces auteurs ont procédé à l'injection veineuse de 0,18 microcurie par Kg de poids, de thymidine d'activité spécifique variant de 320 mc à 1.930mc par millimole, suivie de dosages en série d'eau tritiée et de l'activité du tritium dans les composés non volatiles, dans le sang et les urines.

La disparition du tritium non volatil est incroyablement rapide : 10 à 20% après un seul cycle circulatoire. Le tritium non volatil qui reste en circulation représente de la thymidine mais aussi des produits métaboliques tels que l'acide bêta-amino iso butyrique. Le foie joue un grand rôle dans ce catabolisme (218). L'eau tritiée plasmatique atteint un plateau en 40 minutes. On croit que le temps effectif où la thymidine tritiée est disponible pour les cellules ne dépasse pas 60 minutes. Durant ce temps comme le montrent les calculs effectués à partir du nombre

de grains obtenus à l'autoradiographie (47) les cellules concentrent très activement la thymidine, vraisemblablement non en raison d'un transport actif mais simplement parce que les cellules qui synthétisent de l'ADN incorporent le matériau si rapidement qu'un gradient de diffusion très élevé est constamment maintenu entre la cellule et les liquides extracellulaires.

De ces expériences et de celles d'injection sur la souris, avec canulation du canal thoracique chez le chien (51), le cobaye (64), le rat (86), avec parabiose chez le cobaye (51), sont sorties des masses d'informations dont les interprétations restent malheureusement le sujet de discussions très vives.

Disons cependant que dans la moelle on a les résultats suivants : les cellules souches sont marquées intensément et en moins de 30 minutes. Les cellules érythropoïétiques jusqu'au stade de normoblastes polychromatophiles sont marquées significativement en 15, 30 minutes ; les normoblastes orthochromatiques n'incorporant pas la thymidine parce qu'ils ne se divisent pas, ne deviennent marqués que plus tard. Le pourcentage maximum de marquage dans la série rouge se situe entre 12 et 24 heures. Dans la série granulocytaire le marquage est net 1 heure après l'injection, maximum au troisième jour, encore évident après le cinquième jour. Les mégacaryocytes sont marqués au maximum au cinquième jour, de façon rare au quatorzième jour. Au début un seul noyau est marqué. Au total 2 heures après l'injection presque toutes les mitoses sont marquées.

Dans les ganglions, les cellules réticulaires et les lymphoblastes sont marqués très vite.

Au niveau du sang périphérique, les polynucléaires jeunes marqués sont rares le deuxième jour, marqués à raison de 50 % le cinquième jour, les polynucléaires multisegmentés suivent la même courbe, avec un peu de retard. En ce qui concerne les cellules mononucléées, les monocytes et les grands lymphocytes sont marqués dès les premières 24 heures, au maximum vers 60 heures. Après 10 jours on n'en trouve plus de marqués. Les petits lymphocytes sont marqués beaucoup plus tard et toujours en très petites quantités, (moins de 0, 1 %). Même après des injections itératives de thymidine tritiée pendant 24 heures les petits lymphocytes ne sont pas marqués significativement.

Des études d'incorporation de thymidine tritiée sont aussi poursuivies in vitro sur des cellules qui viennent d'être isolées de la moelle ou du sang d'individus normaux et atteints de diverses maladies. (30)

Si les études de moelle n'apportent guère de nouveaux renseignements grâce à l'aptitude de certaines cellules mononuclées du sang périphérique à incorporer de la thymidine, malgré les difficultés fréquentes pour étiqueter exactement ces cellules, il semble qu'on puisse définitivement écarter les hypothèses de Yoffey sur les multiples potentialités du petit lymphocyte. A partir de ces expériences et d'autres, il semble même qu'on puisse bientôt espérer décrire exactement la vie du petit lymphocyte, qui est sans doute très longue (108)

La propriété d'incorporer de la thymidine tritiée in vitro paraît être le meilleur test de viabilité pour les cellules sanguines prélevées en vue d'une greffe et conservées congelées.

Il est possible aussi que l'on puisse préciser de façon analogue la quantité de rayonnement reçue accidentellement par un sujet (145)

C H A P I T R E Q U A T R I E M E

E X P E R I E N C E S

D O N N E E S P R E L I M I N A I R E S

Nous avons déjà vu l'importance du gradient dans la croissance d'une culture. Il importe donc dans ces études de cinétique de croissance cellulaire de déterminer au préalable le gradient optimum des cellules utilisées.

Pour cela on introduit dans un flacon haut, de section carrée à bouchon vissé, une quantité de suspension de cellules contenant 20 à 500 cellules par mm3, telle qu'elle affleure l'extrémité supérieure de 2 lamelles rectangulaires de 12 x 60 mm placées en position inclinée d'une paroi à l'autre du flacon (Nowell). Le liquide de culture est fait comme nous l'avons déjà indiqué du mélange de 9 parties du milieu décrit par Eagle, à peine modifié par Brooke et Osgood (39) et de 1 partie de sérum humain prélevé depuis au moins une semaine. On y ajoute la quantité de thymidine tritiée à 350 millicuries par millimole nécessaire pour avoir une concentration finale de 0,025 microcurie par millilitre.

On prélève une première lamelle après 6 heures et la deuxième après deux jours; Ces lamelles sont laissées à sécher à l'air, fixées, autora-

diographiées et colorées de la façon que nous verrons plus loin.

Le tableau 1 donne les résultats d'une de ces expériences ; il s'agit ici de la culture 181 J111 qui renferme des cellules d'origine plasmocytaire et d'origine monocytaire. La zone où le marquage est optimum pour les cellules plasmocytaires se situe près de l'extrémité supérieure de la lamelle à environ 1 cm au-dessous de la surface du liquide, celle des cellules monocytaires se situe dans le bas de la lamelle au fond de la bouteille. Les gradients respectifs sont donc approximativement de 0,01 et 0,1. Il faut noter que la zone optimale est très étroite pour les plasmocytes, très large pour les monocytes. Pour les premiers il n'y a pour ainsi dire pas de marquage pour les zones de gradient supérieur à 0,030. Encore trouve-t-on de nombreuses cellules mortes en mitose à la limite supérieure de l'aire de marquage : ceci montre bien que pour les cellules "difficiles" quant à leur gradient du moins, les résultats n'auraient aucune valeur si le gradient correct n'était pas assuré. Au contraire les monocytes ne sont pas aussi difficiles et s'accomodent d'une échelle de gradients étendus.

De même des expériences préliminaires faites avec les cellules d'origine granulocytaire J111 C1 nous ont montré qu'on pouvait pour une hauteur de milieu de 1cm utiliser des suspensions contenant de 10 à 1000 cellules/mm3

On peut aussi remarquer combien ces gradients optimaux ont diminué par rapport à ceux des cellules des mêmes séries au moment où elles sont isolées de l'organisme 0,5 à 2,5 pour les plasmocytes, 1 à 8 pour les monocytes, 1,5 à 6 pour les granulocytes (162)

TABLEAU I

Inoculum : 20 Noyaux par mm3

Gradient initial	Profondeur mm	Noyaux par mm2 inoculés	6 hr	24 hr	Noyaux marqués % 6 hr	Noyaux marqués % 24 hr	Mitoses % 6 hr	Mitoses % 24 hr	Mitoses marqués % 24 hr	Cellules mortes % 6 hr	Cellules mortes % 24 hr
0.006	3	60	75	84	0	19.7	10.7	18.7	56.4	16.3	14.4
0.012	6	120	100	100 +	0	19.3	1.6	3.5	36.4	10.6	5.8
0.018	9	180	78	145 ++	0	18.4	2.5	6.6	10.0	8.7	9.7
0.028	14	280	54	69 ++	0	3.0	0.6	3.3	0.0	17.1	15.9

+ Toutes ces cellules sont plasmocytaires

++ Quelques cellules sont monocytaires

ETUDES FAITES SUR LES CELLULES J111 C1

La plupart des études que nous avons faites ont porté principalement sur les cellules J111 C1 en utilisant la méthode suivante : une suspension cellulaire est distribuée entre 200 flacons environ qu'on peut décrire comme des tubes cylindriques de 21 x 50 mm, sur le fond plat de chacun desquels repose une lamelle de 15 mm de diamètre (ce genre de flacon nous a été suggéré par une publication de Berman, 19). Après incubation dans un milieu contenant de la thymidine tritiée, les lamelles sur lesquelles les cellules se sont fixées, sont prélevées après des intervalles de temps de plus en plus longs. Des contrôles sont faits sur des flacons identiques mais où la thymidine n'est pas tritiée. Après fixation, autoradiographie éventuelle et coloration on procède à la numération des cellules en précisant par mm2 le nombre des cellules vivantes, mortes et en mitose et dans chacune de ces catégories si les cellules sont marquées ou non.

MATERIEL

Les manipulations sont effectuées dans une hotte équipée d'une lampe à U.V. qu'on n'éteint que pour éviter d'irradier les cellules. Cette hotte munie d'orifices sur deux côtés permet de recourir à l'aide d'une 2ème personne pour accélérer les manipulations.

Les flacons sont incubés à 37° dans une étuve spéciale, dite anaérobie où l'on introduit après évacuation de l'air une atmosphère contenant 5 % de carbone. Pour éviter toute évaporation dans les flacons on maintient en permanence dans l'enceinte une cuvette remplie de sérum physiologique additionné d'un antiseptique non volatil. On peut ainsi maintenir les fla-

cons ouverts, recouverts simplement d'une feuille d'aluminium. Au lieu d'utiliser ce genre d'étuve, qui a l'avantage de maintenir tous les flacons au même pH, les flacons peuvent être bouchés individuellement avec des capsules en polyéthylène et incubés dans une étuve conventionnelle ; mais cette fermeture n'est pas rigoureusement hermétique et l'étanchéité n'est pas la même d'un flacon à l'autre d'où des variations de pH.

Les inoculations sont faites au moyen de seringues munies d'un dispositif à ressort qui permet facilement de délivrer une quantité donnée de liquide, ici 2, 8 ml ce qui donne une hauteur de milieu de 1 cm dans ces flacons.

Un agitateur magnétique à barre recouverte de Teflon est utilisé pour maintenir les cellules en suspension pendant le temps de la distribution dans les flacons.

Un compteur électronique de cellules (compteur de Coulter) bien qu'il n'ait pas donné tous les résultats escomptés à tout de même apporté quelque aide dans ces expériences. Rappelons les principes de fonctionnement de cet appareil (36) : une pompe aspire la suspension de cellules à numérer au travers d'un orifice de 100 microns de diamètre. La veine liquide conduit un courant électrique dont le voltage est modifié par le passage des cellules dans l'orifice. Durant le 1/50 000 ou 1/100 000 de seconde où une cellule franchit l'orifice, une certaine quantité du liquide qui est relativement très bon conducteur vis-à-vis de la cellule est déplacée. La résistance du circuit est un peu augmentée et les pulsations du voltage qui en résultent sont amplifiées d'une part pour être visualisées sur un écran oscilloscopique et d'autre part pour être comptées lorsqu'elles dépassent une certaine amplitude.

L'appareil permet de compter les cellules d'un 1/2 ml de suspension en 15 secondes avec les résultats les meilleurs lorsqu'il y a entre 20 000 et 80 000 cellules par 1/2 ml. L'appareil doit être étalonné pour compter les cellules d'une certaine taille en procédant à des numérations de vérification avec les pipettes à numération courantes.

La verrerie utilisée comporte : les flacons où sont stockés habituellement les milieux ; les flacons à pharmacie où sont cultivées les souches de façon routinière, des flacons d'Erlenmeyer de 1 litre où sont placées les suspensions de cellules à distribuer. Une atmosphère d'air avec 5 % de CO^2 y est insufflée pendant toute la durée de l'opération en vue d'éviter l'élévation du ph. Cet équipement comporte encore les flacons d'expérience qui reçoivent les lamelles de 15 mm de diamètre.

Toute cette verrerie est nettoyée avec les méthodes habituelles, mentionnées au premier chapitre (Microsolve). Les bouchons de polyéthylène sont bouillis dans l'alcool à 70°.

Pour faciliter la manipulation des flacons, des porte-flacons en feuille d'aluminium comportant 5 alvéoles ont été construits. Ces porte-flacons sont eux-mêmes groupés par 8 dans des casiers construits eux aussi en aluminium.

Les milieux sont les mêmes que ceux utilisés habituellement. Ils contiennent 100-150 unités de pénicilline par millilitre. La thymidine tritiée utilisée a une activité spécifique de 350 mC/mM. Enfin les cellules sont mises en suspension et séparées les unes des autres avec une solution stock d'EDTA sodique à 1,5 %.

METHODES DE CULTURE

Dans les jours qui précèdent l'expérience on procède dans une dizaine de flacons de culture à des changements fréquents de milieu de manière que les cellules se multiplient rapidement.

On décante les 10 ml de milieu de ces flacons, on les remplace par 9 ml de milieu neuf et on ajoute 1 ml d'EDTA, ce qui assure une concentration d'EDTA de 1,5 ‰. Quelques gouttes d'une solution de bicarbonate de soude sont ajoutées pour amener le pH aux environs de 7,4. Après 20 minutes d'incubation à 37° et une agitation manuelle vigoureuse, le contenu des flacons est réuni dans un flacon d'Erlenmeyer. L'agitateur magnétique est aussitôt mis en route. On prélève 1 ml de cette suspension pour compter les cellules et l'on ajoute sans attendre la quantité de milieu nécessaire pour saturer l'EDTA en calcium (4 volumes).

On procède après la numération à une nouvelle dilution de manière à avoir la densité en cellules voulue. On recompte par précaution, on vérifie qu'on a bien une suspension de cellules isolées (dans l'ensemble du moins)

On procède alors à l'inoculation des 200 flacons qui sont aussitôt mis à l'étuve.

Après un laps de temps de 24 à 72 heures la thymidine est introduite ; ce laps de temps est choisi en fonction de l'aspect des lamelles prélevées après 12, 24, 48 heures etc...

Juste avant le temps 0 la quantité de milieu voulue pour le changer dans tous les flacons est préparée. Une partie de ce milieu reçoit la thymidine

tritiée, l'autre la thymidine simple. En réalité au moins deux concentrations de thymidine sont à préparer, l'une pour les flacons destinés à être examinés après un temps court, l'autre pour les flacons qui doivent être incubés plus de 12 heures et qui risqueraient de subir des dommages du fait de l'irradiation par le tritium. On est d'ailleurs obligé de diminuer l'activité spécifique de la thymidine tritiée en ajoutant de la thymidine simple.

Aussi doucement que possible le milieu de tous les flacons est décanté et remplacé à la seringue automatique par la même quantité de milieu à la thymidine tritiée ou non tritiée.

Après les temps voulus d'incubation les flacons tritiés et non tritiés sont échantillonnés ; à chaque expérience les temps d'incubation et le nombre de flacons ont été variés pour se faire une meilleure idée des évènements et se rendre compte des variations entre flacons supposés identiques.

Pour tous les flacons le milieu est doucement décanté puis la lamelle est saisie avec des pinces. Nous avons renoncé à faire sur les lamelles des numérations avec le compteur de Coulter. Les lamelles sont donc toutes délicatement trempée s deux fois dans du sérum physiologique. Ce rinçage a pour effet de débarrasser les préparations de précipité divers et n'a pas l'inconvénient qu'on pourrait supposer à priori, d'emporter un nombre appréciable de cellules : la centrifugation du liquide de rinçage n'y montre pas la présence d'éléments cellulaires. Puis elles sont fixées à l'alcool méthylique absolu ou, pour la détermination des index mitotiques, à l'alcool acétique au 1/3.

Chaque lamelle est alors collée, cellules au dessus, avec une goutte de résine HSR près de l'extrémité d'une lame.

Les préparations non autoradiographiées peuvent être alors colorées au Giemsa.

MATERIEL ET TECHNIQUE AUTORADIOGRAPHIQUES

Les boites de plaques autoradiographiques à émulsion pelliculable (*) sont conservées hermétiquement fermées, à + 4°. Quelques jours avant les manipulations l'enveloppe de cellophane de la boite est ouverte, et la boite est placée dans un récipient de polyétnylène. Le tout remis au réfrigérateur ; l'émulsion s'humidifie ainsi de façon satisfaisante.

(*) Autoradiographic stripping plates ARL0, Kodak limited Londres.

En chambre noire, en prenant le temps nécessaire pour que l'accommodation à la lumière donnée par une lampe rouge de 25 watts (°) placée à plusieurs mètres au-dessus du sol soit satisfaisante, on procède aux opérations qui suivent : une cuvette est remplie d'eau distillée à 25°. A l'aide d'une lame de rasoir on découpe des fragments d'émulsion d'environ 4 cm de côté. Ceux-ci sont décollés à l'aide de pinces et mis à flotter sur l'eau de manière que la couche sensible qui se trouve du côté opposé à la plaque de verre vienne en contact avec l'eau. Lorsque l'émulsion perd son caractère brillant on pêche le fragment en glissant au-dessous de lui la partie de la lame qui porte la lamelle de manière que l'émulsion déborde un peu sur 3 côtés de la lame et se replie à la face inférieure de celle-ci.

La préparation est séchée immédiatement dans le courant d'air froid d'un ventilateur. L'ensemble des lames est réparti dans des boites en matière plastique qu'on ferme hermétiquement avec un ruban adhésif opaque. Ces boites sont placées à 4°. Après une exposition de 3 à 6 jours on procède au développement des autoradiographies. Dans la chambre noire les lames sont immergées pendant 8 minutes 30 dans un bain à 19° de développeur (°°). On les remue à plusieurs reprises. Puis elles sont rincées dans l'eau distillée à 19° pendant 30 secondes, immergées aussitôt dans un bain fixateur à 19° (+) pour 5 minutes, et après un rinçage de trois minutes à l'eau courante, séchées aussitôt sous un courant d'air froid.

La coloration se fait en déposant une goutte de Giemsa refroidi sur le film au-dessus de la lamelle. On laisse agir 8 à 12 minutes. On rince ensuite à l'eau froide et l'on fait sécher aussitôt.

Les numérations sont faites à l'immersion à l'aide d'un disque de Miller calibré (35), placé dans l'oculaire; On déplace la lamelle autant de fois qu'il est nécessaire pour compter dans chacune de 13 aires distribuées sur la lamelle, environ 70 cellules, soit environ 1 000 cellules par lamelle.

PROBLEMES POSES PAR LE MATERIEL ET LES METHODES

Nous allons les examiner pas à pas :

Un premier point fort important est de savoir si l'on a réellement une suspension de cellules bien isolées les unes des autres, sans agglomérats. En réalité dans les meilleures conditions on n'obtient guère que 90 % de

---

(°) Kodak Safelight (Wratten Series)
(°°) Kodak D 19b
(+) Kodak Acid Fixer

cellules isolées, les 10 % restants sont constitués par des agglomérats de 2, 3 ou 4 cellules. Nous n'avons pas réussi même en utilisant l'appareil de microtamisage imaginé par Earle (63) à obtenir mieux. Notons ici déjà que le compteur de Coulter ne fait pas la différence entre une cellule et un agglomérat.

On peut ensuite se demander si la suspension est bien la même au début et à la fin de l'opération. Nous avons, pour vérifier ce point, recouru à deux moyens. Nous avons comparé à diverses reprises des lamelles de flacons inoculés au début, au milieu, à la fin de l'expérience. On ne trouve aucune différence significative. Nous avons aussi, au cours même de l'inoculation procédé à des numérations au compteur de Coulter et n'avons pas non plus trouvé de différences notables. Nous n'avons donc pas eu à utiliser les méthodes et les appareils d'Earle (63) pour obtenir une suspension à caractères constants.

Il est important de vérifier que le diamètre des lamelles fournies est bien constant : nous avons en fait, été obligés de les trier à l'aide d'une plaque de cuivre percée de trous de diamètre précis. C'est ainsi que nous avons écarté des lamelles de 14, 5 et de 17 mm pour ne garder que celles de diamètre compris entre 14, 95 et 15, 05 mm.

Le nombre des cellules à introduire par flacon doit donner un gradient satisfaisant, il doit en outre permettre des numérations sur lamelle qui soient aisées. Si le nombre de cellules est trop bas la numération est très longue et perd de sa précision. Si l'inoculum est trop dense les cellules après quelques jours sont si nombreuses qu'elles se disposent en plusieurs couches, ce qui rend la lamelle totalement incomptable. Nous avons longtemps espéré que le compteur de Coulter nous aiderait à compter les cellules des lamelles surchargées. Mais nous ne sommes pas arrivés à dissocier avec l'EDTA les agglomérats cellulaires. Même après une agitation manuelle très forte il persistait des groupes de cellules, mais en outre nous avions alors détruit un grand nombre de cellules, dont les fragments étaient suffisamment gros pour être comptés comme cellules par la machine. Aucun des enzymes que nous avons essayés ne nous a donné de meilleur résultat. Nous avons alors voulu essayer de compter les noyaux nus en faisant éclater les cellules suivant les méthodes décrites par de nombreux auteurs (52, 55, 172, 197). L'acide citrique, l'acide tartrique à des concentrations diverses, ne nous ont jamais permis de libérer les noyaux de façon satisfaisante.

Un autre fait s'est opposé à l'utilisation du compteur de Coulter : le sérum du milieu comporte un nombre non négligeable de particules diverses et qui augmente avec le temps. Le compteur les enregistre comme des cellules. Nous n'avons pas réussi à éliminer suffisamment par centrifugation à grande vitesse, ces particules vraisemblablement lipoprotéi-

niques et la filtration du sérum sur verre fritté donne bien un liquide clair mais c'est alors un produit qui a perdu toute ses propriétés pour la culture. Nous pensons donc, contrairement à Harris (93) qui en est satisfait, qu'à moins d'apporter une technique nouvelle il n'est guère possible d'utiliser de façon valable le compteur de Coulter en culture de tissus.

Finalement nous avons en général débuté avec des suspensions contenant 40 à 50 cellules par mm3.

Nous avons ensuite beaucoup hésité sur le mode d'introduction de la thymidine tritiée : la possibilité de la rajouter existait certes mais il aurait été difficile d'en ajouter exactement la même quantité à tous les flacons et nous nous sommes décidés à renouveler à ce moment la totalité du milieu.

Les concentrations et l'activité spécifique de la thymidine tritiée sont déterminées d'après les considérations suivantes : pour les temps d'incubation courts elles doivent être suffisantes pour assurer un marquage net sans qu'on ait besoin de temps d'exposition autoradiographiques exagérement longs, mais le nombre des grains ne doit pas être non plus trop élevé, sinon la reconnaissance des cellules sous-jacentes devient difficile. Pour les temps d'incubation de plusieurs jours il faut recourir à une concentration en thymidine suffisante pour qu'elle reste disponible à un taux élevé tout au long de l'expérience. Mais l'activité spécifique doit en être très réduite si l'on veut que les effets d'irradiation par le tritium ne viennent modifier complètement les résultats. (170). La thymidine a donc été introduite à doses et à activité spécifique telles que non seulement on n'a pu voir dans les flacons incubés le plus longtemps, de marques cytologiques évidentes d'irradiation mais encore que le nombre de cellules vivantes, mortes et en mitose a été trouvé le même sur les lamelles marquées et les lamelles témoins.

Pour nous assurer que les concentrations étaient suffisantes nous avons fait les vérifications suivantes : après une période d'incubation donnée, (courte, moyenne, longue) nous avons transféré le milieu dans un flacon contenant une culture fraiche et aussi identique que possible à celle du premier flacon. Après une incubation de même durée nous avons pu compter sur les autoradiographies un nombre de cellules marquées égal sur les deux lamelles, avec un nombre de grains par cellule sans différence notable. Comme par ailleurs des mesures effectuées avec un compteur à scintillation ont révélé que la radioactivité totale du surnagean reste suffisamment élevée, que la radioactivité de l'eau du surnageant n'augmente pas significativement après une incubation de 288 heures, (contrairement à ce qui se passe, nous l'avons vu, in vivo où un important

pourcentage de la radioactivité plasmatique est à mettre au compte de l'eau tritiée), (51), on peut même penser que la radioactivité du surnageant représente essentiellement celle de la thymidine tritiée restante.

Il semble donc qu'on ait évité le danger souligné par Lajtha (119) de ne pas fournir aux cellules durant tout le temps de l'expérience la thymidine tritiée voulue.

Dans les flacons incubés moins de 12 heures on a utilisé la thymidine tritiée d'activité spécifique 360 mc/mM nécessaire pour avoir 0, 1 microcurie par millilitre de milieu (0, 06 microgramme de thymidine). Pour les temps d'incubation plus longs la dose de thymidine tritiée a été réduite à 0;01 microcurie par millilitre (0, 006 microgramme de thymidine) mais en ajoutant la dose de thymidine ordinaire destinée à réduire 20 fois l'activité spécifique.

L'autoradiographie et la coloration des lamelles nous ont aussi posé des problèmes. Non le choix du matériel autoradiographique : étant donné la distance parcourue par l'émission bêta du tritium, seul le revêtement par un stripping film AR 10 Kodak ou par une couche d'émulsion liquide NTB 2 ou 3 Kodak (104) est possible. Mais le stripping film a des caractéristiques plus constantes et sa manipulation est plus aisée.

L'humidification préalable au réfrigérateur est extrêmement importante : faute de la faire la plupart du temps la pellicule d'émulsion est trop sèche. Non seulement on court le risque de faire apparaitre des décharges d'électricité statique, cause d'artéfact, mais encore le plus souvent la pellicule s'enroule sur elle-même et les manipulations, certains jours secs, même si l'on accroit l'humidité de la chambre noire, peuvent être strictement impossibles. Cette humidification préalable a parfois été trop forte mais le passage de la plaque pendant quelques secondes devant un ventilateur suffit à l'amener au degré d'humidité voulu. Ce traitement n'a pas augmenté le voile de fond.

Il est très important que l'émulsion déborde sur 3 côtés de la lame : ainsi évite-t-on des déplacements secondaires. Le voile de fond a toujours été si bas que nous n'avons pas jugé nécessaire de mettre des agents dessicateurs dans les boites durant l'exposition.
Pour fixer la durée de l'exposition le meilleur moyen nous a encore paru être de développer une ou deux lames tests mais le délai s'est toujours situé entre 3 et 6 jours.

Nous avons essayé de nombreuses colorations au travers de l'émulsion. Si le Giemsa colore très bien les cellules en dehors de la mitose, il est tout-à-fait insuffisant après fixation à l'alcool méthylique, pour les images

mitotiques. Mais nous avons obtenu d'excellents résultats en fixant les lamelles sur lesquelles doivent être établis les index mitotiques, avec un mélange au 1/3 alcool-acide acétique et en utilisant ensuite le Giemsa habituel. Le cytoplasme avec cette méthode est à peine coloré, mais les figures mitotiques sont tout à fait précises. Nous avons même obtenu de magnifiques images chromosomiques en immergeant les lamelles, pendant 30 minutes dans le milieu hypotonique constitué par la solution saline tamponné d'Osgood diluée au 1/3 puis en les fixant par l'alcool acétique après séchage à l'air.

Ajoutons encore un détail : si une autoradiographie est mauvaise nous avons montré qu'il est possible de la refaire. Pour enlever le film on plonge la préparation pendant une trentaine de secondes dans de l'eau à 25°. Il est nécessaire avant de refaire l'autoradiographie de décolorer complètement la préparation dans de l'alcool à 70° additionné d'une trace d'acide chlorhydrique puis dans de l'alcool méthylique pur.

RESULTATS :

On peut penser que la multiplication de ces cellules en culture est identique à celle qui se produit chez l'homme et les mammifères et n'a aucun rapport avec la multiplication des organismes unis ou comme voudrait les appeler Lwoff "non cellulaires" .

Deux arguments plaident en ce sens : il se produit des phénomènes de maturation et les cellules mortes sont nombreuses mais la mort ne se produit pas au hasard car on ne trouve aucune cellule morte marquée avant un délai d'environ 8 heures.

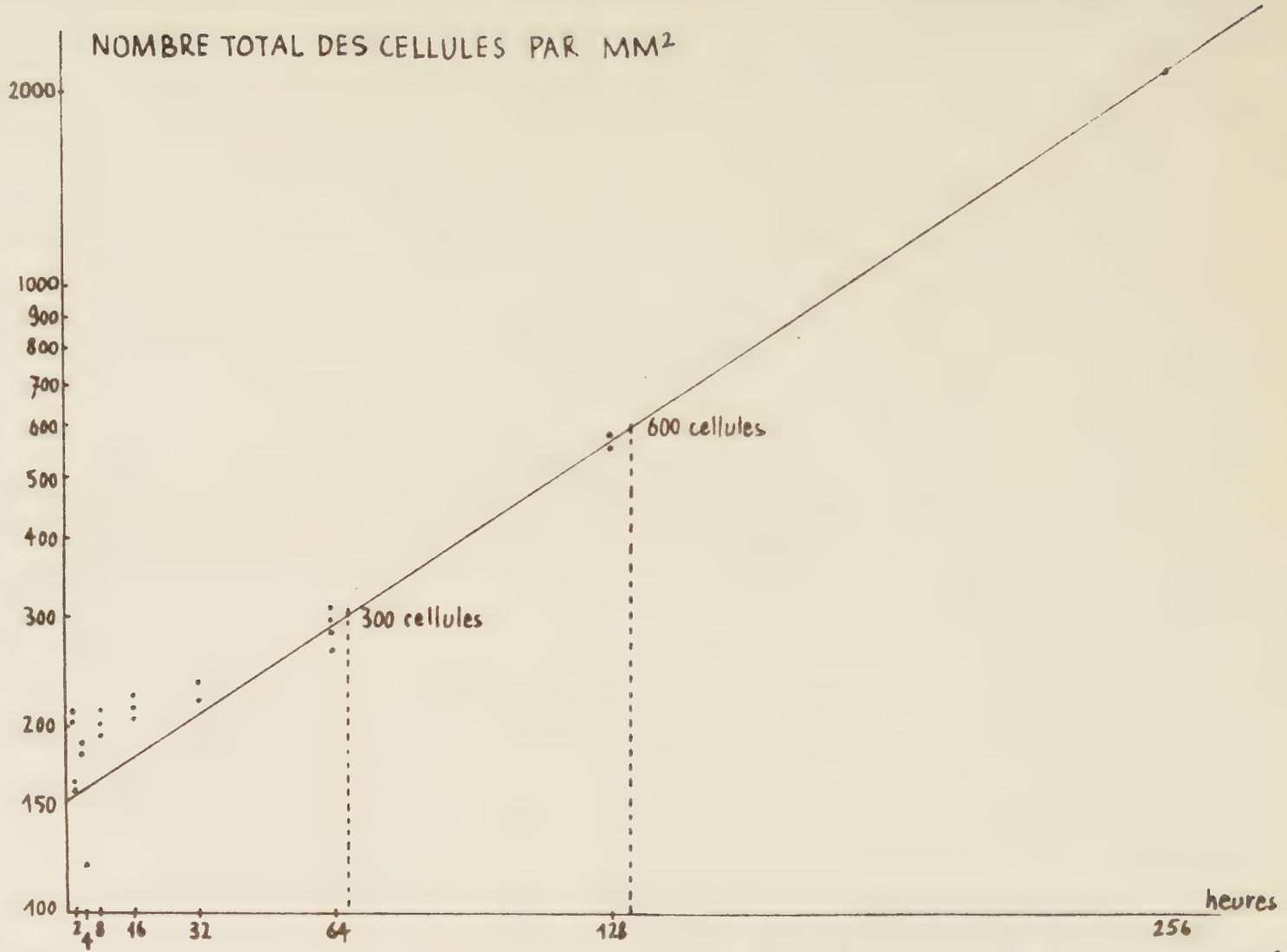
Comme dans le tissu hématopoïétique, dès lors, suivant l'idée d'Osgood (164) doivent exister deux grandes catégories de cellules : celles qui ont une durée de vie finie et celles qui sont potentiellement immortelles (une catégorie intermédiaire à vie finie mais encore capable de se diviser existe in vivo, mais elle rentre dans le premier groupe) . Chaque fois qu'une cellule potentiellement immortelle, alpha, dans la terminologie d'Osgood, se divise elle peut le faire de deux façons : soit en donnant deux cellules alpha soit en donnant une cellule alpha et une cellule dite n. Si elle donnait deux cellules se différenciant ou cellules n il ne resterait plus de cellules alpha

Examinons les résultats d'une expérience donnée, T6. De la partie semilogarithmique de la courbe représentant l'évolution du total de la population par mm2 on tire le temps moyen nécessaire pour que la population double soit 66 heures, tandis que le point d'intersection de cette ligne prolongée et de l'axe des ordonnée soit 150 représenterait le nombre théorique de cellules présentes au temps O.

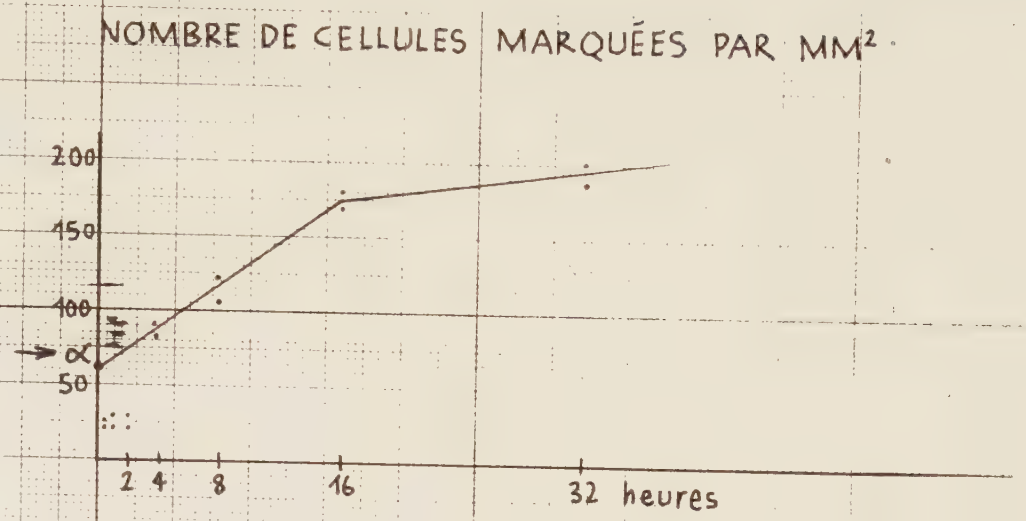
A partir de la courbe de marquage on obtient d'une façon analogue le nombre de cellules alpha présentes au temps 0, ici 60. Autrement dit lors de l'équilibre le rapport entre le nombre des cellules n et celui des cellules alpha est 90/60 soit 1,5.

De la pente de cette courbe on déduit le nombre de cellules marquées par heure soit 7.

Environ 9 heures s'écoulent entre les divisions de chaque cellule alpha. Une seule division sur 7 est une division alpha-2 alpha, six cellules n sont produites pour une cellule alpha, mais il n'y a jamais que 1,5 fois plus de cellules n présentes. Dès lors la durée d'existence totale moyenne d'une cellule n, de sa naissance à sa disparition complète est de $\frac{66 \text{ heures} \times 1,5}{6}$ soit 17 heures. Comme le pourcentage des cellules mor-



Évolution de la population cellulaire par mm² en fonction du temps (expérience T6)



détermination du nombre des cellules alpha à partir de la courbe du marquage des cellules en fonction du temps.

TABLEAU 2

Résultats de l'expérience T 6

Nombre de cellules par mm2 ou pourcentage

Temps heures	Cellules Contrôles		Totales H 3		Cellules marquées		Mortes total	Mortes marquées	Mitoses total	Mitoses marquées	Mitoses total	Mitoses maruqées%
0	320	343	340	327	0	0	180	0	10	0	12	0
0,5	306	242	291	222	22	24	91	0	9	0	11	0
1	242	229	256	214	27	33	43	0	8	0	9	0
2	165	155	163	167	23	28	9	0	7	0	10	0
4	182	210	186	226	82	90	13	0	8	0	13	5
8	202	194	194	211	119	106	34	3	7	9	9	18
16	226	232	214	207	167	178	25	16	8	7	12	38
32	236	238	221	225	184	197	33	31	10	10	14	34
64	295	316	282	264	273	253	40	40	12	12	16	
128	578	563										
256	2 196	1 984										
512	3 210	2 968										

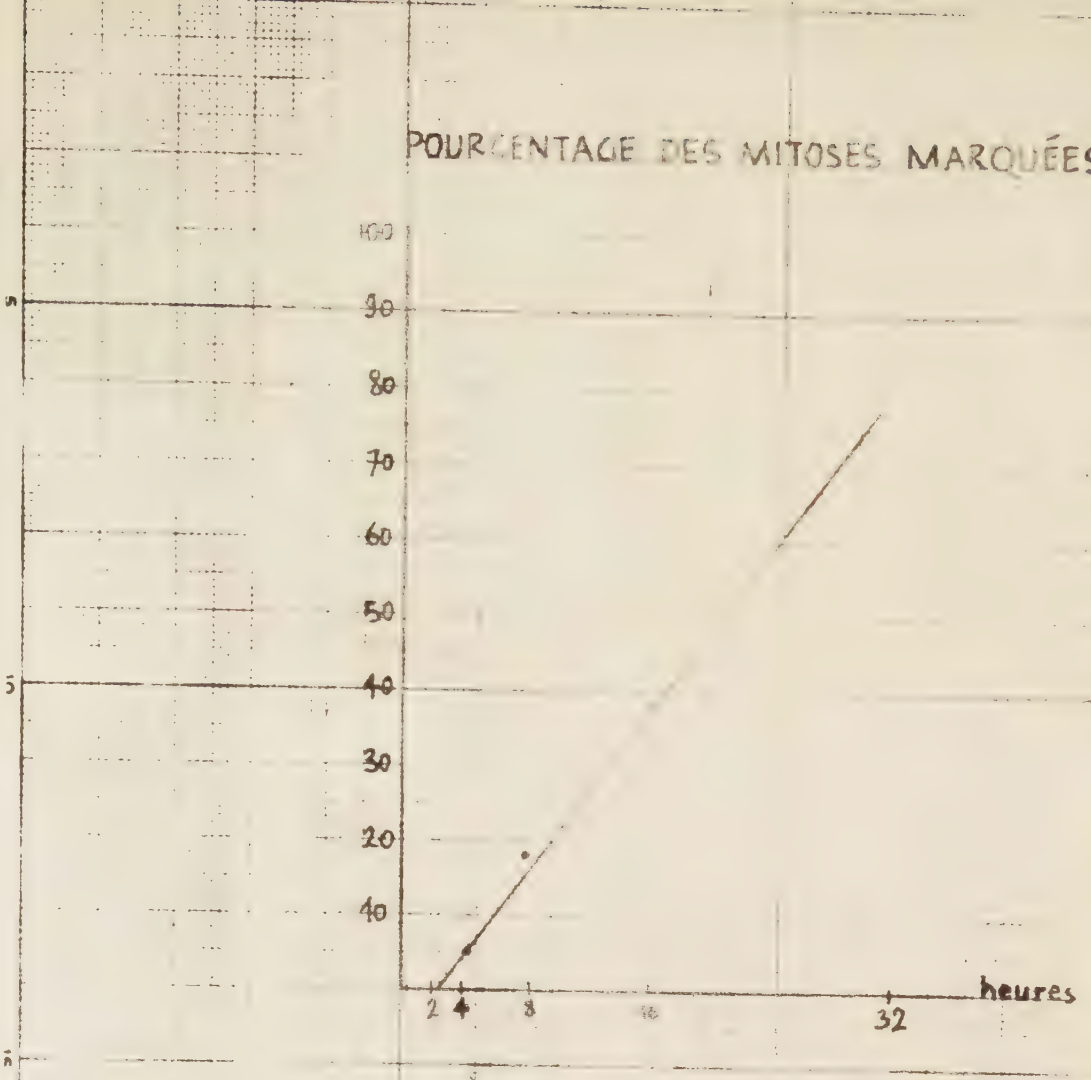
tes est constant (16 % du total soit 24 % des cellules n) le temps d'autolyse serait de $\frac{17 \times 24}{100}$ soit 4 heures et la durée de vie réelle de la naissance jusqu'à la mort apparente d'une cellule n de 13 heures. Comme en moyenne environ 4, 91 % de toutes les cellules présentes sont en mitose et comme les divisions ne se produisent par définition que parmi les cellules alpha 12, 2% des cellules alpha sont en mitose et la durée de celle-ci serait de 9 heures X 12, 2 %, environ 70 minutes. En réalité ceci ne représente que la durée de la métaphase et de l'anaphase car pour plus de sûreté nous n'avons pas compté les prophases parmi les mitoses.

Toutes les cellules alpha qui sont en période synthétique S, suivant Lajtha, au temps O, deviennent marquées très vite et effectivement le nombre des cellules marquées ne varie . guère avant 2 heures : 24 en moyenne ce qui donne une moyenne de 8, 8 heures pour la période S.

La courbe du pourcentage des mitoses marquées extrapolée jusqu'à O coupe la ligne des abcisses à 2 heures ce qui représente la période de repos prémitotique G2. La période de repos postmitotique aurait donc dès lors une durée de 3 heures trante environ.

Au total on peut dans un certain cadre interprétatif, déduire pour chaque expérience les valeurs approximatives qui caractérisent l'évolution de la population cellulaire. Mais il s'agit de valeurs moyennes pour des variables à distribution manifestement très dispersée. De plus les résultats d'une expérience ne sauraient s'appliquer qu'à cette expérience seule. Mais il y a tout de même une certaine constance dans les résultats.

Bien évidemment il serait plus simple de travailler avec des cellules dont la différenciation apparaîtrait morphologiquement et aussi dont le caryotype serait normal ce qui permettrait de pratiquer des numérations de grains . Mais la simplicité relative du système exploré ici rend compte des difficultés des études du même type in vivo (204).



détermination de la durée moyenne du repos prémitotique à partir de la courbe de la variation du pourcentage des mitoses marquées en fonction du temps.

C O N C L U S I O N S

La culture des cellules sanguines a fait au cours des dernières années de réels progrés.

Les techniques actuelles permettent d'obtenir des cultures "à ccurt terme" avec une relative facilité. Osgood propose cette méthode pour préciser les types cellulaires des leucoses aiguës. Peut être sera-t-il possible de réaliser pour les malades atteints d'hémopathies malignes un véritable antimitogramme (20)

L'observation des mitoses dans ces cultures permet d'autre part d'étudier les maladies par aberrations chromosomiques (et nous décrivons à ce propos une technique cytologique particuliérement simple).

Il reste plus malaisé d'isoler des souches de cellules qui puissent être maintenues en culture au "long cours". On ne peut d'ailleurs manquer d'être quelque peu déçu par les caractères que présentent ces cellules après un certain temps : profondément modifiées dans leur taille, leur forme, leurs propriétés biochimiques elles sont particuliérement monstrueuses par leur noyau, souvent multiple, avec de gros nucléoles, et des chromosomes de nombre très variable et d'aspect très anormal. Les cellules isolées sont souvent difficiles à reconnaître mais leurs colonies, leurs exigences en culture varient avec leur origine et des phénomènes de maturation (hémoglobinopoïèse par exemple) y apparaissent de façon indiscutable.

La notion de gradient mise en évidence par Osgood s'est montrée d'une très grande importance. Or le gradient définit une partie de ce qui constitue le microenvironnement cellulaire. C'est au perfectionnement de ce

microenvironnement que les efforts doivent tendre pour obtenir dans l'avenir des résultats plus satisfaisants.

Quoiqu'il en soit ces cellules dérivent de cellules sanguines, sont d'origine humaine, ont au départ ou prennent des caractères de malignité. Il est possible de développer des cultures pures à partir d'une seule cellule (clones) et les recherches hématologiques, cancérologiques, radiobiologiques, génétiques, virologiques etc... disposent ainsi d'un matériel précieux.

Les études isotopiques en culture de tissus se sont montrées d'emblée d'un intérêt particulier. L'autohistoradiographie s'applique particulièrement bien aux cellules en culture : elle permet d'y localiser quelques atomes d'un corps radioactif. Le P32, le Fe59, le S35 sont très utilisés mais le C14 et surtout le tritium donnent une excellente résolution et on peut ainsi repérer l'organite cellulaire où se trouvent les stomes radioactifs

La thymidine tritiée est spécialement remarquable : elle n'entre que dans l'ADN synthétisée préalablement à la division. L'ADN est parfaitement stable et la cellule ainsi marquée le reste jusqu'à la mort ou bien le matériel est réparti entre les deux cellules qui résultent de la division

Les études d'incorporation de thymidine tritiée permettent d'étudier au mieux la cinétique de la multiplication des cellules d'une culture, de mieux prévoir les expériences analogues in vivo et d'en mieux comprendre les résultats. On a pu ainsi décrire avec précision les trois phases de l'intercinèse (repos post mitotique, synthèse d'ADN, repos prémitotique) On a pu également vérifier les fondements même de la science génétique en montrant comment se faisait la répartition chromosomique de l'ADN néoformé.

En hématologie les études sur la multiplication et sur la destinée des divers types de cellules sont reprises sur de nouvelles bases. La thymidine tritiée permet de s'assurer de la vitalité des cellules prélevées et conservées pour la greffe, elle permettra peut être d'établir avec précision la quantité de radiations reçues par un organisme (145)

Dans les expériences que nous rapportons nous avons d'abord pu vérifier l'importance du gradient : les cellules n'incorporent activement la thymidine tritiée qu'au gradient optimum. Nous avons ensuite chercher à évaluer la multiplication des cellules JIIICI, cellules de la série granulocytaire. Nous nous sommes heurtés à certaines difficultés de numération des cellules et avons dû renoncer à l'utilisation du compteur de

Coulter. La concentration et l'activité spécifique de la thymidine utilisée ont été choisies de manière à n'observer aucun effet d'irradiation.

On a pu calculer finalement le rythme de division de ces cellules, leur durée de vie, la durée de la mitose et des diverses phases de l'interci-nèse.

Vu, le Président de Thèse :

Professeur Jean BERNARD

Vu, le Doyen de la Faculté :

Professeur L. BINET

Vu, et permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris :

J. SARRAILH

B I B L I O G R A P H I E

I- ADLER J., LEHMAN I.R., SIMMS E.S., KORNBERG A.
Enzymatic synthesis of DNA IV. Linkage of single deoxynucleotides to the deoxynucleoside ends of DNA.
Proc. Nat. Ac. Sc. I958 44 64I

2- ALBOUY G.
Sur la possibilité de faire disparaître les électrons parasites enregistrés par une émulsion nucléaire sans détruire sa sensibilité.
C. R. Ac. Sc. I950 230 I35I

3- ALFERT M., SWIFT H.
Nuclear DNA constancy: a critical evaluation of some exceptions reported by Lison and Pasteels.
Exptl. Cell Res. I953 5 455

4- ALGIRE G.H.
An adaptation of the transparent chamber technique to the mouse.
J. Nat. Canc. Inst. I943 4 I

5- ALGIRE G.H., BORDERS M.L., EVANS V.J.
Studies of heterografts in diffusion chambers in mice.
J. Nat. Canc. Inst. I958 20 II87

6- ALLGOWER M.
The cellular basis of wound healing.
I Vol. Charles Thomas, Springfield Illinois I956

7- AMANO M., MESSIER B., LEBLOND C.P.
Specifity of labelled thymidine as a DNA precursor in autoradiography
J. Histochem. and Cytochem. I959 7 I53

8- ARNOLD J.
Ueber theilungsvorgänge an den Wanderzellen ihre progressiven und retrogressiven metamorphosen.
Arch. Mikr. Anat. I887 30 205

9- ASTALDI G., MAURI C.
La valutazione dell'attivita proliferation delle cellule midollari. Studio di un test statmocinetico.
Haematologica I949 33 583

IO- ASTALDI G., TOLENTINO P.
Studies in vitro on the maturation of erythroblasts in normal and pathological conditions.
J. Clin. Pathol. I949 2 2I7

II- ASTALDI G., MAURI C., TOLENTINO P.
Influence de la colchicine sur la maturation des érythroblastes et des réticulocytes. Etude sur la moelle osseuse in vitro.
Rev. Belge Path. Med. Exp. I948 I9 IOI

I2- AVERY O.T., McLEOD C.M., Mc CARTY M.
Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types
J. Exptl. Med. I944 79 I37

I3- BAKER L.E., CARREL A.
Effect of the amino acids and dialysable constituents of embryonic tissue juice on the growth of fibroblasts.
J. Exptl. Med. I926 44 397

I4- BALL J.
Establishment of permanent stains from human adult peripheral blood
Nature I958 I82 809

I5- BARON S., LOW R.J.
New maintenance medium for cell culture
Science I958 I28 89

I6- BELANGER L.F., LEBLOND C.P.
A method for locating radioactive elements in tissues by covering histological sections with photographic emulsion
Endocrinology I946 39 8

I7- BELANGER L.F.
A method for routine detection of radiophosphates and other radioactive compounds in tissues. The inverted autograph.
Anat. Rec. I950 I07 I49

I8- BELANGER L.F.
Improvements to the melted emulsion technique of autoradiography.
Nature I952 I70 625

I9- BERMAN L., STULBERG C.S., RUDDLE F.H.
Long term tissue culture of human bone marrow.
Blood I955 IO 896

20- BERNARD J.
Les progrès des chimiothérapies antileucémiques.
Path. Biol. I960 8 337

2I- BERNARD J. et NAJEAN Y.
L'insuffisance médullaire relative
Rev. Fr. Et. Clin. Biol. I960 5 I29

22- BESSMAN M.J., LEHMAN I.R., ADLER J., ZIMMERMAN S.B., SIMMS E.S. KORNBERG A.
Enzymatic synthesis of DNA III. The incorporation of pyrimidine and purine analogues into DNA.
Proc. Nat. Acad. Sc. I958 44 633

24- BERENBAUM M.C.
The autographic localization of intracellular antibody.
Immunology I959 2 7I

25- BENDER M.A.
X-Ray induced chromosome aberration in normal diploïd human tissue cultures
Science I957 I26 974

26- BICHEL J.
Cultivation of leukemic cells in tissue culture
Acta Path. Micro. Scandinavia I952 3I 4II

27- BLOOM W.
Discussion
Ann. N.Y. Ac. Sc' I959 77 754

28- BOIVIN A., VENDRELY R., TULASNE R.
Le rôle des acides nucléiques dans la constitution et dans la vie de la cellule bactérienne.
Bull. Ac. Natl. Med. I949 I3I 39

29- BOND V.P., FLIEDNER T.M., CRONKITE E.P., RUBINI J.R., and ROBERTSON J.S.
Cell turnover in blood and blood forming tissues studied with tritiated thymidine.
The kinetics of cellular proliferation Grune and Stratton N.Y.I959-I88

30- BOND V.P., FLIEDNER T.M., CRONKITE E.P., RUBINI J.R., BRECHER G. SCHORK P.K.
Proliferative potentials of bone marrow and blood cells studied by in vitro uptake of H3 thymidine
Acta Haemat. I959 2I I

3I- BOUCHARD C., CURIE P., BALTHAZARD V.
Action physiologique de l'émanation du radium.
C.R.Ac.Sc. I904 I38 I384

32- BOYD G.A.
Autoradiography in biology and medicine
Academic Press N.Y. 1955

33- BOYD G.A., WILLIAMS A.I.
Stripping film technics for histological radiography
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1948 69 225

34- BRACHET J.
Biochemical cytology
Academic Press N.Y. 1957

35- BRECHER G., SCHNEIDERMAN M.
A time saving device for the counting of reticulocytes
Am. J. Clin. Pathol. 1950 20 1079

36- BRECHER G., SCHNEIDERMAN M., WILLIAMS G.Z.
Evaluation of electronic blood cell counts
Am. J. Clin. Pathol. L956 26 1439

37- BREUER M.E., PAVAN C.
Behavior of polytene chromosomes of rhynchosciara angelae at different stages of larval development
Chromosoma 1956 7 371

38- BROOKE J.H., McNEESE J., OSGOOD E.E.
The gradient tissue culture method as an aid in classification of acute leukemias
Proc. 6th International Congress International Soc. Hemat. N.Y.
Grune and Stratton 1958 237

39- BROOKE J.H., OSGOOD E.E.
Long term mixed cultures of human hemic cells with granulocytic, lymphocytic, plasmocytic and erythrocytic series represented
Blood 1959 14 803

40- BURROWS M.T.
The cultivation of tissues of the chick embryo outside the body
J.A.M.A. 1910 55 2057

41- CALLENDER S.T., LAJTHA L.G.
The effect of citrovorum factor (folinic acid) on megaloblasts in vitro
J. Clin. Pathol. 1951 4 204

42- CARREL A., BURROWS M.T.
Culture de moelle osseuse et de rate
C.R. Soc. Biol. 1910 69 299

43- CARREL A.
The permanent life of tissue outside of the organism
J. Exptl. Med. 1912 15 516

44- CARREL A.
Artificial activation of the growth in vitro of connective tissue
J. Exptl. Med. 1913 17 14

45- CARREL A.
Some conditions of the reproduction in vitro of the Rous virus
J. Exptl. Med. 1926 43 647

46- CARREL A., BAKER L.E.
The chemical nature of substances required for cell multiplication
J. Exptl. Med. 1926 44 503

47- CECCALDI P.F.
L'histo autoradiographie : Principes et méthodes
Bull. Micr. Appl. 1951 1 161

48- CECCALDI P.F., WEILL R., CHARPAL O.
Histo-autoradiographie par précipitation in situ d'halogénures d'argent
Bull. Mic. Appl. 1955 5 39

49- CHANY C.
Communication personnelle

50- CRONKITE E.P.
Anatomic and physiologic facts and hypotheses about hemopoietic proliferating systems
The kinetics of cellular proliferation Grune and Stratton N.Y. 1959 I

51- CRONKITE E.P., BOND V.P., FLIEDNER T.M., RUBINI J.R.
The use of tritiated thymidine in the study of DNA synthesis and cell turnover in hemopoietic tissues
Lab. Inv. 1959 8 263

52- CROSSMAN G.
The isolation of muscle nuclei
Science 1937 85 250

53- DE BRUYN W.M., KORTEWEG R., VAN WAVEREN E.K.
Transplantable mouse lymphosarcoma T86157 (MB) studied in vivo, in vitro and at autopsy
Canc. Res. 1949 9 282

54- DE BRUYN W.M.
In vitro cultivation of malignant lymphoblasts of transplantable mouse lymphosarcoma MB (T 86157) without typical mesenchyme cells
Bijdragen tot de dierkunde 1949 28 77

55- DOUNCE A.L.
Enzymes studies on isolated cell nuclei of rat liver
J. Biol. Chem. 1943 147 685

56- EAGLE H., BARBAN S., LEVY M., SCHULTZ H.
The utilization of carbohydrates by human cell cultures
J. Biol. Chem. 1958 233 551

57- EAGLE H., FREEMAN A.E., LEVY M.
The amino acid requirements of monkey kidney cells in first culture passage
J. Exptl. Med. 1958 107 643

58- EAGLE H.
Amino acid metabolism in mammalian cell cultures
Science 1959 130 432

59- EARLE W.R.
Long term cultivation of animal tissue cells in large cultures
Fed. Proc. 1958 17 967

60- ENDICOTT K.M., YAGODA H.
Microscopic historadiographic technique for locating and quantitating radioactivity elements in tissues
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1947 64 170

61- EVANS V.J., EARLE W.R.
The use of perforated cellphane for the growth of cells in tissue culture
J. Nat. Canc. Inst. 1937 8 103

62- EVANS T.C.
Radio autographs in which the tissue is mounted directly on the photographic plate
Proc. Soc. Biol. Med. 1947 64 313

63- EVANS V.J., EARLE W.R., SANFORD K.K., SHANNON J.E., WALTZ H.K.
The preparation and handling of replicate tissue cultures for quantitative studies
J. Nat. Canc. Inst. 1951 11 907

64- EVERETT N.B., REINHARDT W.O., YOFFREY J.M.
The appearance of labelled cells in the thoracic duct lymph of the guinea pig after the administration of tritiated thymidine
Blood 1960 15 82

65- FAUTREZ J., FAUTREZ-FIRLEFYN W.
DNA content of the cell nucleus and mitosis
Nature 1953 172 119

66- FEINENDEGEN L., BOND V.P., CRONKITE E.P.
Cytochemical studies of RNA metabolism in bone marrow cells
Blood 1960 15 418 Abstract of Am. Soc. Hematol.

67- FELL H.B.
Methods for study of organized growth in vitro. Techniques of bone cultivation
Methods in Medical Research 1951 Chicago Year book Publishers

68- FELL H.B.
Recent advances in organ culture
Sci. Progr. 1953 162 212

69- FIESCHI A., ASTALDI G.
La cultura in vitro del midollo osseo
Tipografia del libro 1946 Pavia

70- FISCHER A.
Growth of fibroblasts and hydrogen ion concentration of the medium
J. Exptl. Med. 1921 34 447

71- FISCHER A.
Transformation des cellules normales en cellules malignes in vivo
C.R. Soc. Biol. 1926 94 1217

72- FISCHER A.
Nature of the growth accelerating substance of animal tissue cells
Nature 1939 144 113

73- FISCHER A.
Amino acids metabolism of tissue cells in vitro
Nature 1948 161 1008

74- FISCHER G.A.
Studies of the culture of leukemic cells in vitro
Ann. N.Y. Ac. Sc. 1958 76 673

75- FISHER H.W., PUCK T.T., SATO G.
Molecular growth requirements of single mammalian cells: the action of fetuin in promoting cell attachment to glass
Proc. Nat. Ac. Sc. 1958 44 4

76- FITZGERALD P.J., EIDINOFF M.L., KNOLL J.E., SIMMEL E.B.
Tritium in radio autography
Science 1951 114 494

77- FITZGERALD P.J., SIMMEL E., WEINSTEIM J., MARTIN C.
Radioautography: theory, technic and applications
Lab. Invest. 1953 2 181

78- FORD C.E., HAMERTON J.L.
The chromosomes of man
Nature 1956 178 1020

79- FORD C.E., HAMILTON J.L.
A colchicine hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosomes
Stain Techn. 1956 31 247

80- FRAZER S.C., DAVIDSON J.N.
Photometric estimations of DNA in individual cell nuclei
Exptl. Cell Res. 1953 4 316

81- FRIEDKIN M., TILSON D., ROBERT D.
Studies of DNA biosynthesis in embryonic tissues with thymidine C14
J. Biol. Chem. 1956 220 627

82- FRIEDKIN M.
Speculations on the significance of thymidine acid synthesis in the regulation of cellular proliferation
The kinetics of cellular proliferation Grune and Stratton N.Y. and London 1959 97

83- GAILLARD P.J.
Parathyroid gland tissue and bone in vitro
Exptl. Cell Res. 1955 3 154

84- GAUTHIER M.
Etude des chromosomes humains sur culture de tissu
Bull. Mem. Soc. Med. Hop. Paris 1959 75 956

85- GOMBERG H.G.
A new high resolution system of autoradiography
Nucleonics 1951 9 28

86- GOWANS J.L.
The transfusion of lymphocytes in experimental animals
The kinetics of cellular proliferation Grune and Stratton 1959 64

87- GROSS J., BODOROCH R., NADLER N.J., LEBLOND C.P.
The theory and methods of the radioautographic localisation of radio elements in tissue
Am. J. Roentgenol. 1951 65 420

88- GROVEN C., GOVAERTS J., GUEBEN G.
Photographic action of artificial radio elements
Nature 1938 141 916

89- GUNTZ F.W.
Culture of human leukaemic blood cells in vitro: technique and the growth curve
Brit. J. Canc. 1948 2 29

90- GUNTZ F.W.
Culture of human leukaemic blood cells in vitro normal and abnormal cell division and maturation
Brit. J. Canc. 1948 2 29

91- HAMILTON J.G., SOLEY M.H., EICHORN K.B.
Deposition of radioactive iodine in human thyroid tissue
Univ. Calif. Publs Pharmacol. 1940 1 339

92- HARRIS M.
The role of bicarbonate for outgrowth of chick heart fibroblasts in vitro
J. Exptl. Zool. 1954 125 85

93- HARRIS M.
Growth measurements on monolayer cultures with an electronic cell counter
Canc. Res. 1959 19 1020

94- HARRISON R.G.
Observations on the living developing nerve fiber
Proc. Soc. Exp. Biol. 1907 4 140

95- HAUSCHKA T.S., MITCHELL J.T., NIEDAPRUEM D.J.
A reliable frozen tissue bank: viability and stability of 82 neoplastic and normal cell types after prolonged storage at - 78° C
Canc. Res. 1959 19 643

96- HEALY G.M., FISHER D.C., PARKER R.C.
Nutrition of animal cells in tissue culture X synthetic medium N° 858
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1955 89 71

97- HERZ R.H.
Photographic emulsion: method to improve the performance of stripping emulsion
Lab. Inv. 1959 8 71

98- HOTCHIN J.E.
Use of methylcellulose gel as a substitute for agar in tissue culture overlays
Nature 1955 175 351

99- HUGHES W.L.
The metabolic stability of DNA
The dinetics of cellular proliferation Grune and Stratton N.Y.
1959 83

100- ISRAELS M.C.
Culture in vitro of leukocytes from human bone marrow
J. Pathol. Bact. 1940 50 145

101- ISRAELS M.C.
The nature of human leukemia evidence from the culture of bone marrow cells in vitro
J. Pathol. Bact. 1940 51 235

102- JACOBS P.A., BAIKIE A.G., COURT-BROWN W.M., STRONG J.A.
The somatic chromosomes in mongolism
Lancet 1959 1 710

103- JAMES T.H.
Photographic development
Scient. Am. 1952 187 30

104- JOFTES D.L.
Liquid emulsion autoradiography with tritium
Lab. Inv. 1959 8 131

105- JOLLY J.
Sur la durée de la vie et de la multiplication des cellules animales en dehors de l'organisme
C.R. Soc. Biol. 1903 55 1266

106- KLINE D.L.
DNA P32 Studies of white blood cell formation distribution and life span
The kinetics of cellular proliferation Grune and Stratton N.Y.
1959 142

107- KOENIG H.
Uptake of adenine 8 C14 and orotic 6 C14 acid into nuclear DNA of non dividing cells in the adult feline neuraxis
J. Biophys. Biochem. Cytol. 1958 4 664

108- KOTZAREFF A.
Photographies des organes par l'émanation du radium ou radiumgraphie (curigraphie)
J. Radiol. Electrol. 1922 4 131

109- LACASSAGNE A., LATTES J., SAMUEL J.
Méthode autohistoradiographique pour la détection dans les organes du polonium injecté
C.R. Acad. Sc. 1924 178 488

110- LACASSAGNE A., LATTES J.
Localisation histologique du polonium à l'intérieur des organes hématopoïétiques
C.R. Soc. Biol. 1924 90 487

111- LACASSAGNE A., LATTES J.
Localisations histologiques spéciales du polonium à l'intérieur de certains organes
C.R. Soc. Biol. 1924 90 485

112- LA COUR L.F., DEELEY E.M., CHAYEN J.
Variations in the amount of Feulgen stains in nuclei of plants grown at different temperatures
Nature 1956 177 272

113- LA COUR L.F., PELC S.R.
Effect of colchicine on the utilization of labelled thymidine during chromosomal reproduction
Nature 1958 182 506

114- LAJTHA L.G., OLIVER R., ELLIS F.
Incorporation of P32 and adenine C14 into DNA by human bone marrow cells in vitro
Brit. J. Canc. 1954 8 367

115- LAJTHA L.G., OLIVER R., KUMATORI T., ELLIS F.
On the mechanism of radiation effect on DNA synthesis
Radiation Res. 1958 8 1

116- LAJTHA L.G.
An inhibitory factor in pernicious anemia serum
Clin. Sc. 1950 9 287

117- LAJTHA L.G.
Culture of human bone marrow in vitro
J. Clin. Pathol. 1952 5 67

118- LAJTHA L.G.
The culture of bone marrow cells in vitro
Brit. Med. Bull. 1959 15 47

119- LAJTHA L.G., PHIL M.D., OLIVER R.
The application of autoradiography in the study of nucleic acid metabolism
Lab. Inv. 1959 8 214

120- LEBLOND C.P.
Classical technics for the study of the kinetics of cellular proliferation
The kinetics of cellular proliferation Grune and Stratton N.Y.
1959 31

121- LEHMAN I.R., BESSMAN M.J., SIMMS E.S., KORNBERG A.
Enzymatic synthesis of DNA I Preparation of substrates and partial purification of an enzyme from Escherichia Coli
J. Biol. Chem. 1958 233 163

122- LEIGHTON J., KLINE I.
Studies on human cancer using sponge matrix tissue culture
Tex. Rep. Biol. Med. 1954 12 I 847
II 865

123- LEIGHTON J., KLINE I.
Transformations of normal human fibroblasts into histologically malignant tissue in vitro
Science 1956 123 502

124- LEIGHTON J.
The growth patterns of some transplantable animal tumors in sponge matrix tissue culture
J. Nat. Canc. Inst. 1954 15 275

125- LEJEUNE J., GAUTHIER M., TURPIN R.
Les chromosomes humains en culture de tissus
C.R. Acad. Sc. 1959 248 602

126- LEJEUNE J., GAUTHIER M., TURPIN R.
Etudes des chromosomes somatiques de 9 enfants mongoliens
C.R. Acad. Sc. 1959 248 1721

127- LEJEUNE J., TURPIN R., DECOURT J.
Aberrations chromosomiques et maladies humaines. Syndrome de Klinefelter XXY à 46 chromosomes par fusion centromérique TT
C.R. Acad. Sc. 1960 250 2468

128- LEJEUNE J., TURPIN R., GAUTHIER M.
Le mongolisme maladie chromosomique
Bull. Acad. Nat. Med. 1959 143 256

129- LEPINE P., SLIZEWICZ P., DANIEL P., PACCARD M.
Cultures cellulaires dans un milieu utilisant l'hydrolysat de caséine comme source d'acides aminés
Ann. I.P. 1956 90 654

130- LEVI H., NIELSEN A.
Quantitative autoradiography. Quantitative evaluation of autoradiograms on the basis of track or grain counting
Lab. Inv. 1959 8 82

131- LEWIS M.R., LEWIS W.H.
The cultivation of sympathetic nerves from the intestine of chicken embryos in saline solution
Anat. Record 1912 6 7

132- LEWIS M.R., LEWIS W.H.
The cultivation of tissues from chick embryos in solutions of NaCl, CaCl2, KCl and NaHCO3
Anat. Record 1911 5 277

133- LIEBERMAN I., OVE R.
Purification of a serum protein required by a mammalian cell in tissue culture
Bioch. Bioph. Acta 1957 25 449

134- LOCKART R.Z., EAGLE H.
Requirements for growth of single human cells
Science 1959 129 252

135- LOEB L.
On the growth of epithelium in agar and blood serum in the living body
J. Med. Res. 1902 8 109

136- LOMHOLT S.
Investigation into the distribution of lead in the organism on basis of a photographic (radiochemical) method
J. Pharmacol. Exptl. Therap. 1930 40 235

137- LONDON E.S.
Etudes sur la valeur physiologique et pathologique de l'émanation du radium
Arch. Elect. Med. 1904 12 363

138- LOWE C.V.
Effects of cortisone on nucleic acid composition of rat liver
J. Natl. Canc. Inst. 1955 15 1619

139- Mc COY T.A., MAXWELL M., NEUMANN R.E.
The amino acid requirements of the Walker carcino sarcoma 256 in vitro
Canc. Res. 1956 6 979

140- Mc DONALD A.M., COBB J., SOLOMON A.K., STEINBERG D.
Stripping film technic for radioautographs
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1949 72 117

141- Mc LIMANS W.F., GIARDINELLO F.E., DAVIS E.V., KUCERA C.J., RAKE G.W.
Submerged culture of mammalian cells: the five liter fermentor
J. Bacter. 1957 74 768

142- Mc QUADE H.A., FRIEDKIN M., ATCHINSON A.A.
Chromosome aberrations caused by thymidine 2C14 in the onion root tip
Exp. Cell Res. 1956 11 256

143- Mc QUILKEN W.T., EVANS V.J., EARLE W.R.
The adaptation of additionnal lines of NCTC clone 929 (stain L) cells to chemically defined protein free medium NCTC 109
J. Nat. Canc. Inst. 1957 19 885

144- MAITLAND H.B., MAITLAND M.C.
Cultivation of vaccinia virus without tissue culture
Lancet 1928 215 596

145- MATHE G.
Problèmes posés à l'hématologiste par le traitement de sujets irradiés accidentellement à haute dose
Revue d'Hémat. 1960 15 1

146- MATHOTH Y., BIEZUNSKI N., SZABO G.
Effects of sera from patients with anoxia on the proliferative activity of human erythropoietic tissue in vitro
J. Lab. Clin. Med. 1953 51 420

147- MAXIMOV A.A.
Sur la production artificielle des myélocytes dans les cultures de tissu lymphoïde
C.R. Soc. Biol. 1917 80 235

148- MAY R.M.
La culture des tissus
SEDES Paris I956

149- MELNICK J.L., RICRDAN J.T.
Poliomyelitis viruses in tissue culture IV protein free nutrient media in stationary and roller tube cultures
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1952 81 208

150- MESSIER B., LEBLOND C.P., SMART I.
Presence of DNA synthesis abd mitosis in the brain of young adult mice
Exp. Cell Res. 1958 14 224

151- MIRSKY A.E., RIS H.
The DNA content of animal cells and its evolutionary significance
J. Gen. Physiol. 1951 34 451

152- MOORE A.E.
Tumorigenic activity of cultures
Ann. N.Y. Acad. Sc. 1958 76 497

153- MURRAY M.R., KOPECH G.
A bibliography of the research in tissue culture, 1884 to 1950
Acad. Press N.Y. 1953

154- MURRAY M.R., STOUT A.P.
Distinctive characteristics of the sympathicoblastoma cultivated in vitro. A method for prompt diagnosis
Am. J. Pathol. 1947 23 429

155- MURRAY M.R., STOUT A.P.
The classification and diagnosis of human tumors by tissue culture methods
Texas Rep. Biol. Med. 1954 12 898

156- ODEBLAD E.
Matrix theory for quantitative evaluation of autoradiographs
Lab. Inv. 1959 8 113

157- ODOM R., REISNER E.H.
Culture of bone marrow on dextrose agar
Clin. Res. Abstract 1959 7 14

158- OSGOOD E.E., MUSCOWITZ A.N.
Culture of human bone marrow: preliminary report
J.A.M.A. 1936 106 1888

159- OSGOOD E.E., BROWNLEE I.E.
Culture of human bone marrow: a simple method for multiple culture
J.A.M.A. 1936 107 123

160- OSGOOD E.E.
Culture of human marrow. Length of life of neutrophils, eosinophils and basophils of normal blood as determined by comparative cultures of blood and sternal marrow from healthy persons
J.A.M.A. 1937 109 933

161- OSGOOD E.E., SEAMAN A.J., TIVEY H.
Etudes radiobiologiques sur les cellules du sang chez l'homme
Rev. Hématol. 1953 8 403

162- OSGOOD E.E., KRIPPAEHNE M.L.
The gradient tissue culture method
Exptl. Cell Res. 1955 9 116

163- OSGOOD E.E., BROOKE J.H.
Continuous tissue culture of leukocytes from human leukemic bloods by application of gradient principles
Blood 1955 10 1010

164- OSGOOD E.E.
Observations on human leukemic cells in culture
The Leukemias Acad. Press N.Y. 1957

165- OSGOOD E.E.
Control of peripheral concentration of leukocytes
Homeostatic Mechanisms - Brookhaven Symposia in Biology 1957
10

166- OSGOOD E.E.
Blood cell survival in tissue cultures
Ann. N.Y. Acad. Sc. 1959 77 777

167- OSGOOD E.E.
Regulation of cell proliferation
Kinetics of cellular proliferation Grune and Stratton N.Y. 1959
282

168- OSGOOD E.E.
Observations on human hemic cells in long term culture
Haematologica Latina 1959 2 53

169- OWENS O.H., GEY M.K., GEY G.O.
Growth of cells in agitated fluid medium
Ann. N.Y. Acad. Sc. 1954 58 1039

170- PAINTER R.B., DREW R.M., HUGHES W.L.
Inhibition of HeLa growth by intranuclear tritium
Science 1958 127 1244

171- PARKER F., NYE R.N.
Studies on filterable viruses. Cultivation of vaccine virus
Am. J. Pathol. 1925 1 325

172- PARKER R.C., HEALY G.M., FISHER D.C.
Nutrition of animal cells in tissue culture VII Use of replicate
cell cultures in the evaluation of synthetic media
Canc. J. Bioc. Physiol. 1954 32 306

173- PARKER R.C., CASTOR L.N., McCULLOCH E.A.
Altered strain in continuous culture. A general survey
Conference on cellular biology, nucleic acids and viruses
N.Y. Acad. Sc. Special Publication 1957 5 303

174- PASTEELS S., LISON L.
Teneur des noyaux au repos en ADN dans différents tissus chez le rat
C.R. Acad. Sc. 1950 230 780

175- PAUL J.
Cell and tissue culture
Livingstone Edimburgh and London 1959

176- PELC S.R.
Autoradiograph technique
Nature 1947 160 749

177- PELC S.R.
Nuclear uptake of labelled adenine in the seminal vesicle of the mouse
Exptl. Cell Res. 1958 14 301

178- PELC S.R.
Metabolic activity of DNA as shown by autoradiographs
Lab. Inv. 1959 8 225

179- PELC S.R.
On the question of automatic or visual grain counting
Lab. Inv. 1959 8 127

180- PLAUT W., MAZIA D.
The distribution of newly synthetized DNA in mitotic division
Texas Rep. Biol. Med. 1957 15 181

181- PLAUT W.
The effect of tritium on the interpretation of autoradiographic studies of chromosomes
Lab. Inv. 1959 8 286

182- POWSNER E.R., BERMAN L.
Erythroblast maturation in human bone marrow cultures: correlation of radioactive hemin formation with morphologic alterations
Blood (abstract) 1960 15 421

183- PUCK T.T., MARCUS P.I.
A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture. The use of X-irradiated cells to supply conditioning factors
Proc. Nat. Acad. Sc. 1955 41 432

184- PUCK T.T.
Quantitative studies on mammalian cells in vitro
Rev. Modern Physics 1959 31 433

185- PULVERTAFT R.J.V., HUMBLE J.G.
Culture de moelle osseuse sur lames tournantes
Rev. Hématol. 1956 11 349

186- REICHARD P., EASTBORN B.
Utilization of desoxyribosides in the synthesis of polynucleotides
J. Biol. Chem. 1951 188 839

187- REISNER E.H. Jr
Tissue culture of bone marrow
Ann. N.Y. Acad. Sc. 1959 77 487

188- RICH, WINTROBE, LEWIS
The differentiation of myeloblasts from lymphoblasts by their manner of locomotion
Bull. Johns Hopkins Hosp. 1939 65 291

189- RIGAS D.A.
Kinetics of isotope incorporation into the DNA of tissues: life span and generation time of cells
Bull. Mathematical Biophysics 1958 20 33

190- RIGAS D.A.
Dynamics of cell proliferation and isotope incorporation into DNA
The kinetics of cellular proliferation Grune and Stratton N.Y.
1959 408

191- RIVERS T.M., WARD S.M.
Nennerian prophylaxis by means of intradermal injections of culture vaccine
J. Exptl. Med. 1935 62 549

192- ROBINEAUX R., BARSKI G.
Chambres pour la perfusion des cultures de tissu et l'observation em microscopie à contraste de phase
Mikroskopie I956 II 65

193- ROELS H.
Mitosis and DNA content of the nucleus
Nature 1954 173 1039

194- ROSE G.G.
Evidence for an intercellular exchange of cytoplasic components between associated cells in tissue culture
Texas Rep. Biol. Med. 1960 18 103

195- ROSE W.C., WIXON R.L., LOCKHART H.B., LAMBERT G.F.
The amino acids requirements of man - XV the valine requirements, summary and final observations
J. Biol. Chem. 1955 217 987

196- SATO G., FISCHER H.W., PUCK T.T.
Molecular growth requirements of single mammalian cells
Science 1957 126 961

197- SANFORD K.K., EARLE W.R., EVANS V.J., WALTZ H.K., SHANNON J.
The measurement of proliferation in tissue culture by enumeration of cell nuclei
J. Nat. Canc. Inst. 1951 11 773

198- SCHILLING E.L., EARLE W.R., EVANS V.J.
Use of perforated cellphane substrate in slide preparation tissue cultures
J. Nat. Canc. Inst. 1950 10 883

199- SCHOOLEY J.C., BRYANT B.J., KELLY L.S.
Preliminary autoradiographic observations of cellular proliferation in lymphoid tissues using tritiated thymidine
The kinetics of cellular proliferation Grune and Stratton N.Y.
1959 208

200- SENGUN A.
Differente chromosomenstruktur in verschiedenen geweben
Experientia 1954 10 175

201- STEINERT G., FIRKET H., STEINERT M.
Synthèse d'ADN dans le corps parabasal de trypanosoma mega
Exptl. Cell Res. 1958 15 632

202- STEINHARDT E., ISRAELI C., LAMBERT R.A.
Studies on the cultivation of the virus of vaccinia
J. Infect. Dis. 1913 13 294

203- STEWART D.C., PAUL L.K.
The liquid medium in tissue culture
Biological Reviews 1954 29 119

204- STOHLMAN F. Jr
Proceeding of a conference on fundamental problems and techniques for the study of the kinetics of cellular proliferation
The kinetics of cellular proliferation Grune and Stratton N.Y. 1959

205- SWIM H.E., PARKER R.F.
Nonbicarbonate buffers in cell culture media
Science 1955 122 466

206- SWIM H.E., HAFF R.F., PARKER R.F.
Some practical aspects of storing mammalian cells in the dry-ice chest
Cancer Res. 1958 18 711

207- SYKES J.A., MOORE E.B.
A new chamber for tissue culture
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1959 100 125

208- TAYLOR J.H., WOODS P.S., HUGHES W.L.
The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium labeled thymidine
Proc. Nat. Acad. Sc. 1957 43 122

209- TAYLOR J.H.
Sister chromatid exchanges in tritium labeled chromosomes
Genetics 1958 43 515

210- TAYLOR J.H.
Autoradiographic studies of the organization and mode of duplication of chromosomes
A symposium on Molecular Biology Univ. Chicago Press 1959

211- TAYLOR J.H.
The organization and duplication of genetic material
Proc. X Int. Cong. Genetics 1959 1

212- THOMSON R.Y., FRAZER S.L.
The DNA content of individual rat cell nuclei
Exptl. Cell Res. 1954 6 367

213- TIJO J.H., LEVAN A.
The chromosome number of man
Hereditas 1956 42 1

214- TOLLES W.E.
Methods of automatic quantitation of microautoradiographs
Lab. Inv. 1959 8 99

215- TRAN BA LOC
Conservation des cellules vivantes aux basses températures
Rev. Franç. Et. Clin. Biol. 1959 4 76

216- TROWELL O.A.
Experiments on lymph nodes cultured in vitro
Ann. N.Y. Acad. Sc. 1955 59 1066

217- TROWELL O.A.
The lymphocyte
Int. Rev. Cytol. 1958 7 235

218- VAN POTTER R.
Metabolic products formed from thymidine
The kinetics of cellular proliferation Grune and Stratton N.Y.
1959 104

219- VENDRELY R., VENDRELY C.
La teneur des noyaux cellulaires en ADN à travers les organes,
les individus et les espèces animales
Experientia 1948 4 434

220- WALLACE J.H., HANKS J.H.
Agar substrates for study of mice epidemiology and physiology in
cells in vitro
Science 1958 128 658

221- WALKER P.M.B., YATES H.B.
Nuclear components of dividing cells
Proc. Roy. Soc. 1952 B-140 274

222- WALKER B.E., LEBLOND C.P.
Sites of nucleic acid synthesis in the mouse visualized by radio
autography after administration of C14 labeled adenine and thymidine
Exptl. Cell Res. 1958 14 510

223- WATSON J.D., CRICK F.J.C.
Genetical implications of the structure of DNA
Nature 1953 171 964

224- WEAVER J.M., ALGIRE G.H., PREHN R.T.
Growth of cells in vivo in diffusion chambers III The role of cells in the destruction of homografts in mice
J. Nat. Canc. Inst. 1955 15 1737

225- WILLMER E.N.
Tissue culture. The growth and differentiation of normal tissues in artificial media
Methuen London 1954

226- YAGODA H.
Radioactive measurements with nuclear emulsions
J. Wiley and sons N.Y. 1949

227- ZAJDELA F.
Une nouvelle technique autohistoradiographique
J. Rad. et Electrol. 1952 33 549

TABLES DES MATIERES

Introduction 1

Chapitre I - Culture de tissus 3

- Les débuts de la culture de tissus 3
- Les techniques actuelles 7
- La culture des cellules sanguines 17

Notion de gradient 21
Méthodes d'Osgood 22

Chapitre II - Autoradiographie 27

- Les progrès de l'autoradiographie 28
- Fonctionnement des émulsions nucléaires .. 31
- Images autoradiographiques 35
- Principaux procédés pratiques 38

Chapitre III - Métabolisme de l'ADN, thymidine tritiée . 44

- Thymidine tritiée 46
- Etudes hématologiques 48

Chapitre IV - Expériences 51

- Données préliminaires 51
- Prolifération des cellules J111 C1 53

Conclusions 64

Bibliographie 67

AGEMP
POLYCOPIE
8, rue Dante
PARIS-Ve
Téléphone : ODÉon 58-90